

はじめに

母乳に含まれるヒトミルクオリゴ糖(HMOs)は、Gal・Glc・GlcNAcなどの単糖が多様な結合様式で連なった100種以上の複雑な混合物であり、ヒト乳に特有の重要な生理活性成分である(図1)。なかでも末端にラクト-*N*-ビオースI(LNB: Galβ1-3GlcNAc)を有するI型HMOsは、ヒト以外の哺乳類乳にはほとんど含まれない構造的特徴をもち、ヒト乳の特異性と機能性を示す重要なHMOsであると考えられている¹。これらHMOsは乳児腸内でビフィズス菌を選択的に増殖させ、腸管バリアの強化、病原体付着阻害、免疫調節など、多面的な健康機能を発揮することが知られている。しかし、HMOsの化学合成や発酵生産には高コスト・低収率・選択性の不十分さといった課題が存在し、現在でも多くのHMOsが海外企業によって限定的に製造されているにとどまっている。特にI型HMOsに属するラクト-*N*-テトラオース(LNT)やラクト-*N*-フコペンタオースI(LNFPI)は構造が複雑であるため、試薬としても極めて高価であり、腸内細菌叢解析や代謝トレース実験などの *in vitro* / *in vivo* 研究を十分なスケールで実施することは、大型予算を獲得しない限り現実的に困難である。また、乳児栄養・機能性食品・医療栄養といった応用分野においても、安定で低コストな供給体制が整っていないことが課題となっている。

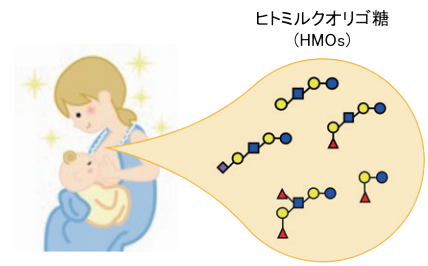


図1 母乳に含まれるヒトミルクオリゴ糖

本研究では、HMOsの中で基本骨格となるコア四糖LNTとそのフコシル化HMO(LNFPI)を対象とし、グリコシターゼ化による高収率なHMOs合成と、ホスホリラーゼ逆反応による安価なドナー基質の酵素的供給を融合した、高収率・低コストの新規酵素合成法の確立を目的とした。加えて、これらの合成反応メカニズムをタンパク質立体構造に基づいて詳細に解明することを目指した。本研究により、I型HMOsのうちコア構造であるLNTおよびLNFPIの酵素合成基盤を構築し、腸内細菌研究、栄養科学、機能性食品開発における応用研究を進めることが期待される。

ラクト-*N*-テトラオース分解酵素LNBaseのグリコシターゼ化によるLNT合成

ラクト-*N*-ビオシダーゼ(LNBase)は、四糖LNTをLNBとラクトースへ切断する酵素である。糖質加水分解酵素136ファミリー(GH136)のLNBaseの構造解析を行って詳細な反応メカニズムを明らかにした²。この構造情報から、活性中心における基質認識部位と触媒残基の配置が明らかとなり、LnbXのグリコシターゼ化設計の基盤が得られた(図2)。グリコシターゼ化とは、求核触媒残基などの活性残基に変異を導入することで加水分解活性を低下させ、反応中間体のアナログをドナー基質として用いることで、糖転移反応を保ったまま元々の基質を合成する方法であり、糖鎖化学において非常に有用な手法である³。本手法を用いてLNTの酵素合成を検討した。まず、α-F-GlcNAcとGal-1-PからGNB/LNBホスホリラーゼによりLNB-α-Fを合成し、これをドナー基質として用いた。GH136 LNBase LnbXの求核残基AspをSerに置換したLnbX D418Sを用い、アクセプターであるラクトースと同時に作用させるワンポット反応により、LNTの酵素合成に成功した。さらに、ラクトース濃度を上昇させることで収率が40%に達することが分かり、従来の酵素法と比較しても高い収率でLNTを合成できることが明らかとなった。

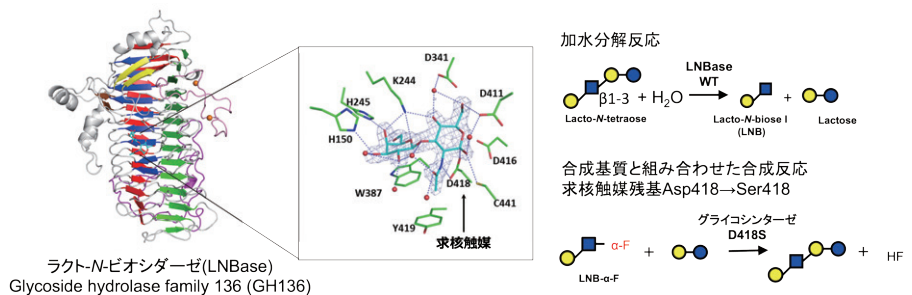


図2 ヒトミルクオリゴ糖LNTに作用するラクト-*N*-ビオシダーゼによる加水分解反応と、そのグリコシターゼ化によるLNT合成反応

グリコシターゼ化酵素の結晶構造解析と合成メカニズム

グリコシターゼ化したLnbX D418S変異体の反応機構を明らかにすることを目指し、結晶構造解析を行った。2.47Å分解能でLNBとの複合体構造を決定した。*N*-アセチルグルコサミンのC1位水酸基がα-アノマー状態をとることが明らかとなった。野生型で

はβ-アノマーとして観察されることから、本結果は反応経路が加水分解から糖転移へと変化していることを示唆する。また、このα-アノマー構造は、グライコシターゼ反応の供与体であるLNB-α-Fの構造を反映している可能性がある。さらに、他のAlaやGlyへの変異体ではLNT合成が確認されなかったことと合わせて、本構造が反応特異性の違いを説明する一因であることが示唆される。C1位水酸基はSer418の方向を向き、近傍のAsp416との水素結合によって安定化されていた。これらの結果から、Ser418への置換により加水分解反応が遮断されるとともに、活性中心における基質配置および水素結合ネットワークの再編成が生じ、糖転移反応に適した構造環境が形成されることが示唆された。今後は、リガンドフリー構造における水分子の配置や、LNB-α-FおよびLNTとの複合体構造の取得を通じて活性中心近傍の相互作用の変化を明らかにし、LNT合成反応の分子機構の理解と酵素設計への展開が期待される。

今後の展望

今後は、これまで得られたLnbX変異体を基盤として、LNT合成反応における各種パラメーターを最適化する。具体的には、基質濃度、とくにラクトース濃度、pH、温度、酵素量、反応時間などの条件を幅広く検討し、それぞれが収率に与える影響を詳細に解析する。あわせて、HPAEC-PADやNMRによる詳細な分析を進め、生成物の同定と反応条件の最適化を行う予定である。さらに、LNB-α-Fを精製したうえで詳細なカイネティックパラメーターを取得し、触媒効率を定量的に評価することで、収率50~60%以上の達成を目指し、最終的にはグラムスケールでの合成へと展開する。また、本酵素はLNTの非還元末端ガラクトースにフコースやシアル酸が結合したLNFPIやLSTaに対しても作用することが分かっており、これらの合成への応用も期待される。さらに、他のGH136酵素が示す基質特異性を利用することで⁴、フコシル化HMOを含む多様なオリゴ糖合成へと展開できる可能性がある。本研究により、グライコシターゼの触媒機構や基質認識に関する新たな知見が得られると同時に、LNTおよびLNFPIの高収率かつグラムスケールでの酵素合成法の確立が期待される。これにより、*in vitro*、*in vivo* 実験に使用可能な量のHMOsを供給できるようになり、特定のHMO分子種に特化した機能を詳細に明らかにすることにつながる。また、粉ミルク、医療栄養、機能性食品向けHMOs原料の安定供給とコスト低減にもつながると期待される。

謝辞

本研究は、京都大学、東京大学、および明治大学で行われました。研究の遂行にあたり、伏信進矢教授(東京大学)、片山高嶺教授(京都大学)をはじめ、北岡本光教授(新潟大学)、本多裕司教授(石川県立大学)、東京大学大学院農学生命科学科応用生命工学専攻酵素学研究室と京都大学大学院生命科学研究所分子応答機構学研究室、明治大学農学部農芸化学科発酵食品学研究室のスタッフの皆様、学生の皆様に多大なるご支援・ご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Urashima, *et al.*, *Glycoforum*. 27 (2), A5 (2024).
2. Yamada, C. *et al.*, *Cell Chem. Biol.* 24, 515-524.e5 (2017).
3. Jakeman, D. L. and Withers, S. G. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 14, 13-25 (2002).
4. Pichler, M. J. *et al.*, *Nat. Commun.* 11, 3285 (2020).

略歴

- 2013年 3月 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 博士課程修了 博士号(農学)取得
- 2013年 4月 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 特任研究員
- 2016年 4月 日本学術振興会特別研究員PD
- 2018年 4月 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 助教
- 2023年 4月 明治大学農学部農芸化学科 専任講師
- 2026年 4月 明治大学農学部農芸化学科 専任准教授

Enzymatic Synthesis of Human Milk Oligosaccharides and Elucidation of the Mechanisms

Chihaya Yamada, Department of Agricultural Chemistry, School of Agriculture, Meiji University

Introduction

Human milk oligosaccharides (HMOs) are complex mixtures composed of more than 100 oligosaccharide species consisting of monosaccharides such as Gal, Glc, and GlcNAc linked through diverse glycosidic linkages, and they represent important bioactive components characteristic of human milk (Fig.1). Among them, type I HMOs containing lacto-*N*-biose I (LNB; Gal β 1-3GlcNAc) at the nonreducing terminus have a structural feature that is rarely found in the milk of other mammals and are considered to be important HMOs responsible for the unique properties and functions of human milk¹. These type I HMOs are known to exert multiple beneficial effects, including the selective stimulation of bifidobacterial growth in the infant gut, reinforcement of the intestinal barrier, inhibition of pathogen adhesion, and modulation of immune responses. However, both chemical synthesis and fermentative production of HMOs still face serious problems such as high cost, low yield, and insufficient selectivity, and many HMOs are still produced only on a limited scale by overseas companies. In particular, lacto-*N*-tetraose (LNT) and lacto-*N*-fucopentaose I (LNFPI), both belonging to type I HMOs, are structurally complex and therefore extremely expensive even as research reagents. As a result, it is difficult in practice to perform *in vitro* and *in vivo* studies, including gut microbiota analysis and metabolic tracing experiments, on a sufficient scale unless a large research budget is available. In addition, the lack of a stable and low-cost supply system remains a major issue in applied fields such as infant nutrition, functional foods, and medical nutrition.

In this study, we focused on the core tetrasaccharide LNT and its fucosylated HMO derivative, LNFPI, and aimed to establish a novel enzymatic synthesis platform that combines high-yield HMO production by glycosynthase engineering with the enzymatic supply of inexpensive donor substrates through the reverse reaction of phosphorylases. In addition, we sought to elucidate the mechanisms underlying these synthetic reactions in detail on the basis of protein crystal structures complexed with ligands. This work is expected to provide a foundation for the enzymatic synthesis of the type I HMOs LNT and LNFPI, and to promote applied research in gut microbiology, nutritional science, and functional food development.

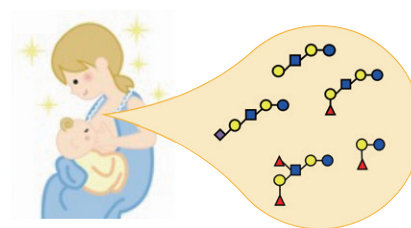


Figure 1. Human milk oligosaccharides (HMOs)

Synthesis of LNT by Glycosynthase Engineering of LNBBase, an LNT-Degrading Enzyme

Lacto-*N*-biosidase (LNBBase) is an enzyme that cleaves the tetrasaccharide LNT into LNB and lactose. We previously determined its crystal structure and elucidated its detailed reaction mechanism². This structural information revealed the substrate-recognition site and the arrangement of catalytic residues in the active site, providing the basis for the rational design of a glycosynthase variant of LnbX (Fig. 2). Glycosynthase engineering is a highly useful strategy in glycochemistry in which catalytic residues, such as the nucleophilic residue, are mutated to reduce hydrolytic activity, and substrate analogs that mimic the reaction intermediate are used to drive glycosidic bond formation while retaining glycosyl transfer activity³. Using this strategy, we investigated the enzymatic synthesis of LNT. First, LNB- α -F was synthesized from α -F-GlcNAc and Gal-1-P using GNB/LNB phosphorylase and used as the donor substrate. We then employed LnbX D418S, in which the nucleophilic Asp residue of GH136 lacto-*N*-biosidase LnbX was replaced with Ser, and successfully synthesized LNT in a one-pot reaction in the presence of lactose as the acceptor substrate. Furthermore, increasing the concentration of lactose raised the yield to 40%, demonstrating that LNT can be synthesized at a higher yield than with previously reported enzymatic methods.

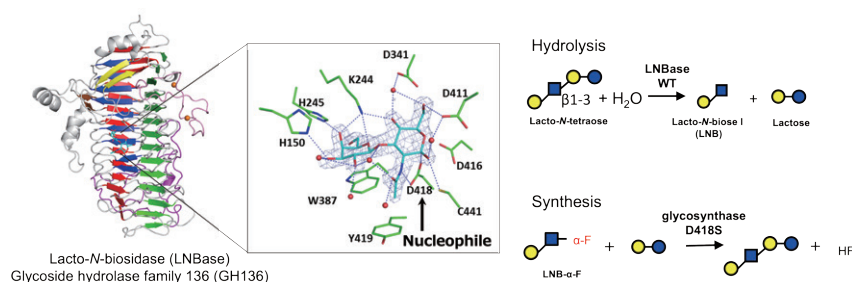


Figure 2. Hydrolysis of the human milk oligosaccharide lacto-*N*-tetraose (LNT) by lacto-*N*-biosidase and synthesis of LNT from a synthetic substrate by the glycosynthase variant D418S.

Crystallographic Analysis of the Glycosynthase Variant and the Mechanism of Synthesis

To elucidate the reaction mechanism of the glycosynthase-engineered LnbX D418S mutant, we performed X-ray crystallographic analysis and determined its complex structure with LNB at 2.47 Å resolution. The hydroxyl group at C1 of the *N*-acetylglucosamine residue was found to adopt the α -anomeric configuration. In contrast, the wild-type enzyme

captures LNB in the β -anomeric form, suggesting that the reaction pathway is shifted from hydrolysis to glycosyl transfer in the D418S mutant. This α -anomeric structure may also reflect the conformation of LNB- α -F, the donor substrate used in the glycosynthase reaction. Furthermore, together with the observation that other mutants, such as the Ala and Gly variants, did not produce LNT, this structure appears to explain, at least in part, the differences in reaction specificity among the mutants. The C1 hydroxyl group was oriented toward Ser418 and stabilized by hydrogen bonding with the nearby Asp416. These results suggest that substitution of Asp418 with Ser not only blocks the hydrolytic reaction but also reorganizes substrate positioning and the hydrogen-bonding network within the active site, thereby creating a structural environment favorable for glycosyl transfer. Future studies will focus on clarifying changes in interactions around the active site through analysis of water molecules in the ligand-free structure and determination of complex structures with LNB- α -F and LNT. These analyses are expected to deepen our understanding of the molecular mechanism of LNT synthesis and to provide a basis for further enzyme design.

Future Perspectives

In future work, we will optimize various reaction parameters for LNT synthesis on the basis of the LnbX variants obtained so far. Specifically, we will systematically examine substrate concentrations, especially lactose concentration, as well as pH, temperature, enzyme amount, and reaction time, and analyze in detail how each factor affects the yield. In parallel, we will perform detailed product analyses by HPAEC-PAD and NMR to identify the products and optimize the reaction conditions. In addition, purified LNB- α -F will be used for detailed kinetic analysis in order to quantitatively evaluate catalytic efficiency and achieve yields of 50-60% or higher, with the ultimate goal of gram-scale synthesis. This enzyme also acts on LNFPI and LSTa, in which fucose or sialic acid is attached to the nonreducing terminal galactose of LNT, suggesting that it may be applicable to the synthesis of these derivatives as well. Furthermore, the substrate specificities of other GH136 enzymes may allow this approach to be extended to the synthesis of a broader range of oligosaccharides, including fucosylated HMOs⁴. This study is expected to provide new insights into the catalytic mechanism and substrate recognition of glycosynthases, while also establishing a high-yield, gram-scale enzymatic synthesis platform for LNT and LNFPI. Such a platform will make it possible to supply HMOs in amounts sufficient for *in vitro* and *in vivo* experiments, thereby enabling detailed functional analyses of individual HMO species. It is also expected to contribute to the stable supply and cost reduction of HMO ingredients for infant formula, medical nutrition, and functional foods.

Acknowledgements

This work was carried out at Kyoto University, the University of Tokyo, and Meiji University. I would like to express my sincere gratitude to Professor Shinya Fushinobu (The University of Tokyo), Professor Takane Katayama (Kyoto University), Professor Motomitsu Kitaoka (Niigata University), Professor Yuji Honda (Ishikawa Prefectural University), and all the staff and students of the Laboratory of Enzymology, Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the Laboratory of Molecular Mechanisms and Responses, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, and the Laboratory of Fermented Foods, Department of Agricultural Chemistry, School of Agriculture, Meiji University, for their generous support and valuable assistance.

References

1. Urashima, *et al.*, *Glycoforum*. **27** (2), A5 (2024).
2. Yamada, C. *et al.*, *Cell Chem. Biol.* **24**, 515-524.e5 (2017).
3. Jakeman, D. L. and Withers, S. G. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **14**, 13-25 (2002).
4. Pichler, M. J. *et al.*, *Nat. Commun.* **11**, 3285 (2020).

Brief Biography

- March 2013** Ph.D. in Agricultural Science, Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
- April 2013** Project Researcher, The University of Tokyo
- April 2016** JSPS Research Fellow (PD)
- April 2018** Assistant Professor, Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
- April 2023** Lecturer, Department of Agricultural Chemistry, School of Agriculture, Meiji University
- April 2026-** Associate Professor, Meiji University