

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14379

研究課題名(和文)ユニークな糖代謝から紐解くビフィズス菌と乳児の共生機構

研究課題名(英文) Sugar utilization strategy of bifidobacteria that supports the symbiosis with their hosts

研究代表者

阪中 幹祥 (Sakanaka, Mikiyasu)

京都大学・生命科学研究科・特定准教授

研究者番号：60801892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：母乳栄養児の腸管ではビフィズス菌が優勢な細菌叢が形成される。これは、母乳に含まれるオリゴ糖(母乳オリゴ糖)をビフィズス菌が効率良く取り込み・代謝できるためと考えられている。しかしながら、母乳オリゴ糖の取り込みの分子機構は不明な部分が多い。本研究は、母乳オリゴ糖の取り込みに関わる新規輸送体をビフィズス菌において同定し、母乳オリゴ糖を介したビフィズス菌と乳児の共生機構の一端を理解することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、乳児期に形成される腸内細菌叢は、乳児期のみならず生涯にわたりヒトの健康に関与していることが示されている。したがって、有益な乳児腸内細菌叢である「ビフィズス菌優勢な細菌叢」が如何にして形成されるかを理解することは非常に重要である。本研究では、ビフィズス菌の乳児腸内での増殖機構の一端を解明することができた。本研究で得た知見は、ビフィズス菌が優勢な細菌叢の形成手法を今後確立するのに役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bifidobacteria are predominant in the guts of breastfed infants, which is mainly attributed to the ability of bifidobacteria to utilize oligosaccharides contained in breast milk (human milk oligosaccharides; HMOs). However, the molecular mechanisms of the HMO uptake remain unclear. Our study identified new HMO transporters from bifidobacteria, which expanded our understanding of the symbiotic mechanism between bifidobacteria and infants mediated by HMOs.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌 母乳オリゴ糖 トランスポーター 遺伝子操作 共生

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内には数百種類の細菌から構成される腸内細菌叢が形成されており、ヒトの健康に密接に関連している。成人の腸内では多種多様な細菌叢が形成されるのとは対照的に、母乳栄養児の腸内ではビフィズス菌が優勢な多様性の低い細菌叢が形成される。乳児期の腸内細菌叢は、乳児期のみならず、その後のライフステージにおいても宿主の健康に影響を及ぼすことが近年数多く報告されている。したがって、ヒトの健康に有用なビフィズス菌優勢な細菌叢の形成機構を解明することは非常に重要である。現在のところ、当該細菌叢が形成されるのは、母乳に含まれるオリゴ糖(母乳オリゴ糖)をビフィズス菌が効率良く取り込み・分解できるためと考えられている。これまでビフィズス菌における母乳オリゴ糖分解・代謝の分子機構は幅広く解明されてきているものの、本オリゴ糖の取り込みの分子機構は不明な部分が多かった。

2. 研究の目的

上述の通り、ビフィズス菌における母乳オリゴ糖の取り込み機構は十分に分かっていなかった。本研究は、母乳オリゴ糖を介したビフィズス菌と乳児の共生機構を理解するために、母乳オリゴ糖の取り込みに関わる新規輸送体をビフィズス菌において同定することを目指した。また、同定した輸送体のホモログがビフィズス菌ゲノム上にどの程度分布しているのかを調べることで、ビフィズス菌が母乳成分にどのようにして適応進化しているのかを理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 基質結合タンパク質の母乳オリゴ糖への結合試験

ビフィズス菌由来の基質結合タンパク質(シグナルペプチド領域は排除)を大腸菌内で過剰発現し、その後、その組換えタンパク質の精製を行った。精製は、硫安沈殿法、陰イオンクロマトグラフィー、およびゲルろ過クロマトグラフィーにより行った。組換えタンパク質の精製度合いを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した後、等温滴定型熱量計を用いた解析を実施し、当該タンパク質がどの基質に対して結合するかを生化学的に調査した。基質としては、種々の母乳オリゴ糖分子種およびそれらの構成糖を使用した。

(2) ビフィズス菌の培養試験

ビフィズス菌は嫌気チャンバー内で 37 °C (N₂ 80 %、CO₂ 10 %、H₂ 10 %) で培養した。培地は、システインおよびアスコルビン酸ナトリウムを添加した MRS 液体培地または Basal 液体培地 (Asakuma *et al.*, 2011, *J Biol Chem*, 286:34583) を使用した。単独培養の際は、菌の生育は OD₆₀₀ を測定することによりモニターした。競合培養の際は、特異的プライマーを用いた定量 PCR により菌の生育を解析した。

(3) ビフィズス菌ゲノムにおける輸送体ホモログの分布解析

本研究で同定した輸送体ホモログのビフィズス菌ゲノム上における分布を調査した。ホモログ検索は、tblastn 解析により実施した。データベースとしては、565 株のビフィズス菌のゲノム配列を用いた。

4. 研究成果

(1) フコシル化母乳オリゴ糖輸送体の同定

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* において、フコシル化母乳オリゴ糖輸送体の機能を解析した。これまで、乳児腸内に棲息するビフィズス菌がフコシル化母乳オリゴ糖を資化できる能力は株依存的であることが知られている (Thomson *et al.*, *Food Microbiol*, 2018, 75:37)。また、*B. longum* subsp. *infantis* 由来の 2 つの ATP 結合カセット輸送体の基質結合タンパク質(フコシルラクトース輸送体 1 の FL1-BP およびフコシルラクトース輸送体 2 の FL2-BP) が 2'-フコシルラクトース(母乳オリゴ糖の主要成分)に結合することがグライカンアレイによってこれまで明らかにされている (Garrido *et al.*, 2011, *PLoS One*, 6:e17315)。本研究では、これらの基質結合タンパク質の基質特異性を、等温滴定型熱量計を用いた母乳オリゴ糖への結合試験などで解析したところ、FL1-BP と FL2-BP はどちらも 2'-フコシルラクトースを主要な基質とするが、FL2-BP はさらに多くの種類のフコシル化母乳オリゴ糖に結合できることが明らかとなった。さらに、これら二つの基質結合タンパク質遺伝子欠損株を *B. longum* subsp. *infantis* において作出し、母乳オリゴ糖混合物の存在下で単独培養を行ったところ、野生株と欠損株で生育に差がないことが明らかとなった。その一方で、これらの 2 株を母乳オリゴ糖混合物存在下で競合培養した場合には、欠損株は野生株より菌数が大幅に低下することが明らかとなり、欠損した輸送体のフコシル化母乳オリゴ糖取り込みにおける重要性が示された。

また、*Bifidobacterium catenulatum* subsp. *kashiwanohense* が有するフコシルラクトース輸送体 2 ホモログ(基質結合タンパク質のアミノ酸配列は約 70 %一致)を、母乳オリゴ糖を取り込めな

いように改変した *B. longum* subsp. *longum* 株で異種発現したところ、本輸送体はフコシルラクトース輸送体 2 と同じ基質を取り込む能力を持つことが明らかとなった。

(2) その他の母乳オリゴ糖輸送体の同定

別の母乳オリゴ糖であるラクト-*N*-テトラオースを取り込む輸送体を機能解析した。これまで、乳児腸内に棲息する多くのビフィズス菌株はラクト-*N*-テトラオースを資化できることが知られている (Thomson *et al.*, Food Microbiol, 2018, 75:37)。また、*B. longum* subsp. *longum* 由来のガラクト-*N*-ビオース/ラクト-*N*-ビオース I 基質結合タンパク質 (GL-BP; ATP 結合カセット輸送体の構成タンパク質) が低い親和性ながらもラクト-*N*-テトラオースに結合することが分かっている (Suzuki *et al.*, 2008, 283:13165)。本研究では、*B. longum* subsp. *infantis* が有する GL-BP ホモログを、等温滴定型熱量計を用いた母乳オリゴ糖への結合解析に供したところ、*B. longum* subsp. *infantis* 由来の GL-BP ホモログは、*B. longum* subsp. *longum* 由来の GL-BP よりも高い効率でラクト-*N*-テトラオースに結合できることが示された。対照的に、ラクト-*N*-ビオース I に対しては、GL-BP ホモログ間で結合能にほとんど差がなかった。この結果より、GL-BP を含む ATP 結合カセット輸送体は、ホモログ間でラクト-*N*-テトラオースの取り込み能が異なる (取り込み能が高いタイプと低いタイプに分類される) ことが強く示唆された。さらに、当該輸送体遺伝子が種々の糖質取り込みにどの程度寄与しているかを明らかにするために、その遺伝子の欠損株を培養試験に供した。その結果、ラクト-*N*-テトラオースまたはラクト-*N*-ビオース I を炭素源とした際には、遺伝子欠損株の増殖能が大幅に低下することが明らかとなった。一方で、コントロールであるラクトースを炭素源とした場合は、野生株と欠損株の生育に差は見られなかった。以上より、GL-BP を含む ATP 結合カセット輸送体は、ラクト-*N*-テトラオースおよびラクト-*N*-ビオース I の取り込みに重要であることが示された。

(3) ビフィズス菌ゲノム上における母乳オリゴ糖輸送体ホモログの分布

(1) で解析した FL1-BP および FL2-BP ホモログのビフィズス菌ゲノム上における分布を tblasn 解析により調査した。その結果、FL1-BP と FL2-BP ホモログは、乳児腸内を主な棲息地とするビフィズス菌種のゲノム上に比較的よく保存されていることが明らかとなった。FL2-BP ホモログは、*B. longum* subsp. *infantis* および *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* において 86% 以上の株で、*B. longum* subsp. *longum*、*Bifidobacterium breve* および *Bifidobacterium pseudocatenulatum* において 13% 以下の株で保存されていた。FL1-BP ホモログは、*B. longum* subsp. *infantis* において 57% の株で、*B. breve* において 4% の株で保存されていた。また、これらの輸送体ホモログは、他のビフィズス菌種 (成人腸内やヒト以外の動物腸内を主な棲息地とするビフィズス菌種) では保存されていなかった。フコシルラクトース輸送体 2 (FL2-BP) がビフィズス菌ゲノム上に広く分布されていることに加えて、当該輸送体が幅広い種類のフコシル化母乳オリゴ糖を取り込めることから、フコシルラクトース輸送体 2 (FL2-BP) が母乳栄養児腸内でのビフィズス菌優勢な細菌叢の形成に特に重要な役割を果たしていると考えられた。

(2) で解析した GL-BP ホモログのビフィズス菌ゲノム上における分布を tblasn 解析により調査した。その結果、GL-BP ホモログは乳児腸内を主な棲息地とするビフィズス菌種において幅広く保存されていることが示された (389 株中 374 株)。さらに、ラクト-*N*-テトラオース取り込み能が高いタイプの輸送体ホモログは種依存的というよりもむしろ株依存的に保存されている傾向にあることが明らかとなった。一方で、成人腸内やヒト以外の動物腸内を主な棲息地とするビフィズス菌種のゲノム上には、GL-BP ホモログはほとんど保存されていなかった。

また、その他の母乳オリゴ糖取り込み・分解関連遺伝子や母乳成分の代謝関連遺伝子ホモログの分布も調査したところ、それらの遺伝子も基本的には乳児腸内を主な棲息地とするビフィズス菌種のゲノム上に保存されていることが示された。以上より、種々の解析を通して、母乳栄養児腸内におけるビフィズス菌の適応進化戦略の一端を解明することができたと考えられる。

< 引用文献 >

Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, Yoshida E, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H, Ashida H, Hirose J, Kitaoka M. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. J Biol Chem, 2011, 286:34583–34592.

Garrido D, Kim JH, German JB, Raybould HE, Mills DA. Oligosaccharide binding proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveal a preference for host glycans. PLoS One, 2011, 6:e17315.

Suzuki R, Wada J, Katayama T, Fushinobu S, Wakagi T, Shoun H, Sugimoto H, Tanaka A, Kumagai H, Ashida H, Kitaoka M, Yamamoto K. Structural and thermodynamic analyses of solute-binding protein from *Bifidobacterium longum* specific for core 1 disaccharide and lacto-*N*-biose I. J Biol Chem, 2008, 283:13165–13173.

Thomson P, Medina DA, Garrido D. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. Food Microbiol, 2018, 75:37–46.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sakanaka Mikiyasu, Hansen Morten Ejby, Gotoh Aina, Katoh Toshihiko, Yoshida Keisuke, Odamaki Toshitaka, Yachi Hiroyuki, Sugiyama Yuta, Kurihara Shin, Hirose Junko, Urashima Tadasu, Xiao Jin-zhong, Kitaoka Motomitsu, Fukiya Satoru, Yokota Atsushi, Lo Leggio Leila, Abou Hachem Maher, Katayama Takane	4. 巻 5
2. 論文標題 Evolutionary adaptation in fucosyllactose uptake systems supports bifidobacteria-infant symbiosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaaw7696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aaw7696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakanaka Mikiyasu, Gotoh Aina, Yoshida Keisuke, Odamaki Toshitaka, Koguchi Hiroka, Xiao Jin-zhong, Kitaoka Motomitsu, Katayama Takane	4. 巻 12
2. 論文標題 Varied pathways of infant gut-associated Bifidobacterium to assimilate human milk oligosaccharides: prevalence of the gene set and its correlation with bifidobacteria-rich microbiota formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12010071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katoh Toshihiko, Ojima Miriam N, Sakanaka Mikiyasu, Ashida Hisashi, Gotoh Aina, Katayama Takane	4. 巻 8
2. 論文標題 Enzymatic adaptation of Bifidobacterium bifidum to host glycans, viewed from glycoside hydrolyases and carbohydrate-binding modules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8040481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Laursen Martin F, Sakanaka Mikiyasu, von Burg Nicole, Morbe Urs, Andersen Daniel, Moll Janne Marie, Lind Mads Vendelbo, Dragsted Lars O, Katayama Takane, Frandsen Henrik L, Vinggaard Anne Marie, Bahl Martin I, Brix Susanne, Agace William, Licht Tine R, Roager Henrik M (4名省略)	4. 巻 2020.01.22.914994
2. 論文標題 Breastmilk-promoted bifidobacteria produce aromatic lactic acids in the infant gut	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.01.22.914994	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Sakanaka Mikiyasu, Hansen Morten Ejby, Gotoh Aina, Katoh Toshihiko, Yoshida Keisuke, Odamaki Toshitaka, Yachi Hiroyuki, Sugiyama Yuta, Kurihara Shin, Hirose Junko, Urashima Tadasu, Xiao Jin-zhong, Kitaoka Motomitsu, Fukiya Satoru, Yokota Atsushi, Lo Leggio Leila, Abou Hachem Maher, Katayama Takane
2. 発表標題 Evolutionary adaptation occurred in human milk oligosaccharide transporters supports symbiosis between breast-fed infants and bifidobacteria
3. 学会等名 Keystone Symposia, Microbiome: Therapeutic Implications (T1) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阪中 幹祥
2. 発表標題 母乳オリゴ糖トランスポーターの機能解析から見出されるビフィズス菌の適応進化戦略
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阪中 幹祥
2. 発表標題 人乳成分の代謝から考えるビフィズス菌の適応進化戦略
3. 学会等名 ビフィズス菌研究会設立記念第一回シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------