

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05789

研究課題名(和文) ムチン資化性菌由来スルフォグリコシダーゼの機能解明と酵素の応用的展開

研究課題名(英文) Functional analysis and application of sulfoglycosidase from mucin-assimilating bacteria

研究代表者

加藤 紀彦 (Kato, Toshihiko)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40724612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト腸内細菌による宿主糖タンパク質の分解は菌叢形成と維持あるいは有益な代謝物産生、さらには粘膜恒常性維持や疾患と深く関連している。本研究はBifidobacterium bifidumの硫酸化ムチン糖鎖分解メカニズムに関して、膜結合型細胞外スルフォグリコシダーゼBbhIIを例に、構造生物学的、酵素生化学的解析、あるいはオミクス解析を通して明らかにした。特に、本菌がcarbohydrate-binding module依存的なムチン分解メカニズムを有することを示すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸内細菌によるムチン分解の詳細なメカニズムを明らかにしたものである。ムチンの硫酸化は潤滑物質としての効果以外にも、粘膜・粘液バリア機能に寄与することが知られている。従ってムチン分解の亢進は上皮と腸内細菌の直接接触する機会を増してしまうことから慢性的な炎症(炎症性腸疾患)につながると考えられている。本研究から得られた糖質分解酵素に関連する様々な基盤的知見は、過剰なムチン分解を抑制するような炎症性腸疾患の治療法の開発においても有益な情報となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Degradation of host glycoproteins by human intestinal bacteria is closely related to the formation and maintenance of flora and production of beneficial metabolites, as well as to mucosal homeostasis and disease. In this study, we investigated the mechanism of sulfated mucin glycan degradation by Bifidobacterium bifidum, using the membrane-bound extracellular sulfoglycosidase BbhII as an example, through structural biology, enzymatic biochemical analyses, and omics analyses. In particular, we succeeded in demonstrating that this bacterium has a carbohydrate-binding module-dependent mucin degradation mechanism.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ムチン Bifidobacterium bifidum 糖鎖 スルフォグリコシダーゼ グライコミクス CBM GH20

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト腸内に共生する腸内細菌は、宿主（ヒト）の免疫系形成、神経発達のみならず、種々の疾患に深く関与するが、未だ分子レベルでのそれら相互関連メカニズムの全容を解明するに至っていない。健康なヒトの腸管内では、上皮細胞から分泌されるムチンを主成分とする粘液層によって腸内細菌叢は腸管上皮粘膜層から別け隔てられている。しかし、非常に多様性に富んだ細菌群である腸内細菌の中には、粘液層を分解・資化能を有する *mucin-degrader* (ムチン分解者) と呼ばれる菌種が存在する。*Mucin-degrader* は粘液ムチン (MUC2) などに付加されている糖鎖を分解し、一部を栄養源とするが、さらに菌叢中にその分解物が分配されることで、バランスの取れた腸内細菌叢形成の一助になると考えられている。一方で、ムチンの欠損やムチン分解者による過剰な分解によって粘液層に穴が開くと、腸内細菌が腸管粘膜層に直に接触可能となり自然免疫分子を介した炎症が惹起する。近年、食餌中の難消化性食物繊維が少ない場合において腸内細菌によるムチン分解が亢進し、病原性菌に対する感受性増大に関係するという報告がなされた (Desai *et al*, 2016 *Cell*)。これらは最終的に大腸がんや炎症性腸疾患などにつながると考えられている (Velcich *et al*, 2002, *Science*)。常在性ムチン分解者として、肥満や二型糖尿病の抑制にかかわることが知られる *Akkermansia* 属、他にも *Bacteroides* 属、*Prevotella* 属細菌、あるいはプロバイオティクスの *Bifidobacterium* 属細菌などが知られる一方で、腸内細菌によるムチン分解がどのように制御されるのか、その機構に関しては未だ十分に理解されていない。

研究代表者の着目する *Bifidobacterium bifidum* は、ヒトミルクオリゴ糖・ムチン糖鎖に特徴的な糖鎖構造の代謝に適したいくつかのグリコシダーゼを細胞膜上に保持する。さらに近年、*B. bifidum* が膜結合型細胞外糖鎖分解酵素としてスルフォグリコシダーゼ (BbhII) を同定した (Kato *et al*, 2017, *B.B.B.*)。本酵素は硫酸化されたムチン型糖鎖に作用し、6位硫酸化 *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc-6S) を遊離する。一般にムチンは糖鎖の硫酸化修飾によって、より分解抵抗性が増しバリア機能性が増大すると考えられている。また、硫酸化糖鎖の分解は、従来、スルファターゼによる脱硫酸基とそれに続くグリコシダーゼによる糖残基の加水分解による経路が知られていた。したがって、硫酸化糖鎖を遊離する本酵素は、脱硫酸化を経ない第2のムチン分解経路の鍵酵素であると推察される。腸内細菌によるムチン分解機構において、スルフォグリコシダーゼの機能的役割やその腸内環境への影響に関する基礎的知見は、腸内細菌叢形成メカニズムの基盤的知識をより強固にすると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、従来知られていたスルファターゼを介するムチン分解経路とは違った、スルフォグリコシダーゼによるユニークな腸内細菌によるムチン分解経路の重要性とメカニズムの解明を、構造生物学的、糖鎖生物学的視点から目指す。

これまで、ビフィズス菌由来スルフォグリコシダーゼ BbhII はブタ胃由来ムチンから GlcNAc-6S を遊離することを明らかにしている。本研究ではさらに、糞便中の *bbhII* 遺伝子量と残存するムチン糖鎖量との相関性の解析を行うことで、スルフォグリコシダーゼによるムチン分解の重要性を考察するとともに、マウス腸管における *in vivo* 解析を行い、スルフォグリコシダーゼの腸管内における重要性と菌叢に対する影響を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) X線結晶構造解析

タンパク質は大腸菌発現システムによってC末端ヒスタグ融合タンパク質として発現させた。タンパク質精製にはNi-NTAカラム、MonoQ陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムによるクロマトグラフィーによって行った。結晶化は11 mg/mL BbhIIおよび10 mM GlcNAc-6S、ならびに等量のリザーバー溶液 (20% (w/v) PEG 3350, 0.2 M KCl) を用いてシッティングドロップ法によって行った。回折データはSPring 8および高エネルギー加速器機構研究所Photon Factoryにおいて得た。

(2) タンパク質の生化学的解析

等温滴定カロリメトリー (ITC) はITC200 (MicroCal, Malvern Panalytical) を用いて行った。タンパク質は100 μ M、リガンドは1 mM、温度は30 $^{\circ}$ Cで測定した。ELISAは間接法にて行った。すなわち、ブタ胃ムチン (Sigma) あるいはブタ結腸ムチン (北里大西山啓太博士より恵与) を固定化し、BbhII-CBM32-His6タンパク質と抗ヒスタグ抗体、HRP標識抗IgG抗体の複合体を添加した。洗浄後TMB基質と反応し、塩酸にて反応を停止した。OD₄₅₀の吸光度を測定した。

ムチン分解におけるCBMの重要性の解析はpNP基質およびブタ胃ムチンを基質としてGlcNAc-6S遊離量を測定した。GlcNAc-6S-pNPとの反応時は遊離pNP量を吸光度により測定した。ムチンを基質として用いた場合にはGlcNAc-6Sを2-アミノ安息香酸によって蛍光標識したのちにHPLCにて定量した。反応には精製酵素あるいは各BbhIIバリエントを異種発現させた

*Bifidobacterium longum*株を用いた。

(3) マウス投与実験

マウスはC57BL/6 (コンベンショナル飼育)を用いた。餌はD12450H (Research Diet)を使用した。馴化ののち、コントロール群には200 μ L PBSを、投与群には*B. bifidum*懸濁液 (109 cfu/200 μ L in PBS)を5日間連続で投与した。投与前と5日後の糞便、あるいは盲腸を採取し、Dionexによる遊離糖解析およびムチン抽出を行った。qPCRを用いて、*bbhII*遺伝子による*B. bifidum*の定量と16S rRNA遺伝子による総菌数の定量を行った。*O*-グライコミクスは既報に従って行った (Takada *et al*, 2020 *J. Appl. Glycosci.*)。菌叢解析は16S rRNA遺伝子 (V3-V4領域)のPCR産物の次世代シーケンサー解析によって行った。

(4) ヒト糞便解析

ヒト乳児糞便は長尾助産院 (京都府向日市)より母親の同意のもと健康な日本人乳児 (0.2-13か月)のものを収集した。また成人糞便は日本人ボランティア (10代-60代、男性8名、女性10名)より収集した。糞便は凍結乾燥後にDNA抽出およびLC-MSMSによるGlcNAc-6Sの分析に供した。

4. 研究成果

(1) BbhII の結晶構造解析

これまでスルフォグリコシダーゼの結晶構造は解かれていなかったためBbhIIについてX線結晶構造解析を行った。BbhIIの最小活性保持領域 (39-861 aa)のタンパク質について結晶化を試みた。セレンウムを用いたsingle-wavelength anomalous dispersion法によってGlcNAc-6Sとの共結晶において1.65 \AA の分解能で解析像を得た (Fig. 1)。BbhIIは3つのドメイン、すなわち、N末端側の β サンドイッチ構造を取るCBM32ドメイン (46-197 aa)、 $(\beta/\alpha)_8$ barrel foldをとるGH20触媒ドメイン (198-750 aa)、そしてC末端側の β サンドイッチ構造をとるドメイン (751-861 aa)からなっていた。GlcNAc-6SはCBM32ドメインと触媒ドメインの2箇所に結合が見られた。またDaliサーバー検索の結果、*Streptomyces plicatus*由来GH20 β -HexNAcase (*Sp*HEX, PDB ID: 1HP5)との構造相同性が見られた (RMSD = 2.0 \AA)。BbhII-GlcNAc-6S複合体構造はProtein Data Bankに登録済みである (PDB ID: 7WDT)。

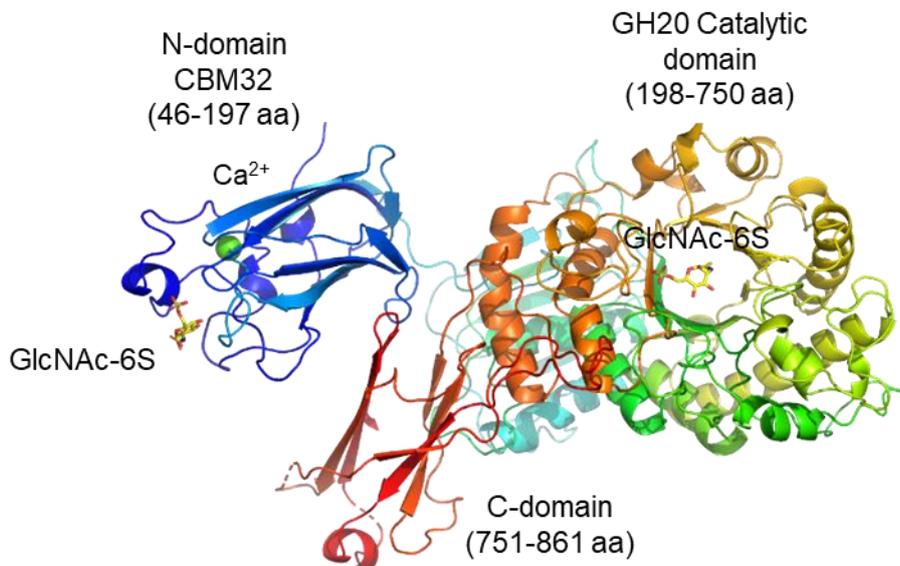


Fig. 1, BbhII-GlcNAc-6S複合体の全体構造(リボンダイアグラム)

(2) BbhII-CBM32 のムチン分解における促進的役割

X線結晶構造解析の結果として BbhII-CBM32 ドメインと GlcNAc-6S の結合が検出されたため、その相互作用について ITC 解析および ELISA による特異性の解析を行った。ITC 解析の結果、BbhII-CBM32 ドメインは GlcNAc-6S- β -pNP に対してタンパク質：リガンド比が 1 : 1 で結合し、その解離定数 (K_d) はおよそ 25 μ M であった。またこの結合は硫酸基依存的であり、CBM32 ドメイン中の Trp-183 残基が認識に重要な働きをしていることも明らかとなった。また ELISA の結果、BbhII-CBM32 ドメインはブタ胃ムチン (PGM) およびブタ結腸ムチン (PCM) と結合可能であり、その結合は GlcNAc-6S の添加によって阻害された。

さらに、CBM32 ドメインの基質との結合がムチン分解に果たす役割について明らかにするために、野生型酵素 (WT)、W183A 変異体酵素 (W183A)、CBM32 ドメイン欠損体 (Δ CBM) の

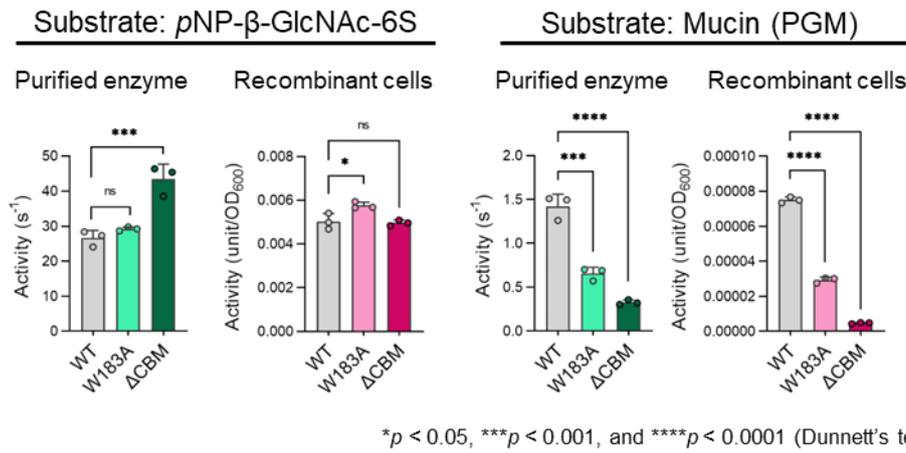


Fig. 2, BbhIIのGlcNAc-6S遊離活性におけるCBM32ドメインの役割

活性比較を行った。その結果、GlcNAc-6S-pNPを基質として用いた反応ではGlcNAc-6S遊離速度に大きな差は観察されなかったが、ムチン(PGM)を基質として使用した場合はW183Aおよび Δ CBMにおいて活性の大幅な低下が観察された(Fig. 2)。これらの結果はCBM32ドメインがムチン分解に重要な役割を果たしていることを意味している。

(3) *B. bifidum* 投与はマウス糞便ムチンの分解を促進する

本菌の*in vivo*におけるムチン分解性を確認するために、マウス(コンベンショナル飼育)に5日間経口投与を行った(10^9 cfu/day/mouse)。投与後の糞便からムチンタンパク質を抽出し、O-グライコミクス解析を行った。その結果、コントロール群(PBS投与)に比べ、菌投与群は短鎖のO-glycanの比率が上昇していることが明らかとなり、本菌が確かにムチン糖鎖を分解することを示していた(Fig. 3)。なお、糞便菌叢に占める本菌の割合は $3.7 \pm 0.8\%$ (qPCR結果)であった。さらには、盲腸内容物中の遊離しているムチン構成糖(シアル酸、フコース、ガラクトース、GalNAc、GlcNAc、GlcNAc-6S)の割合について調べたところ、GlcNAc-6Sの割合が菌投与群において有意に増加していた。これはスルフォグリコシダーゼBbhIIによってGlcNAc-6Sが遊離したことを支持している。他のムチン構成糖についても*B. bifidum*は遊離するが、これらは盲腸中の他の微生物によってすぐさま代謝される可能性がある。GlcNAc-6Sは糞便中では逆に投与前後を比較すると投与後に存在量が低下していた。これは*B. bifidum*の投与によってマウス腸管中のGlcNAc-6S代謝能を有する菌が増加した可能性を示唆していた。そこで糞便菌叢のLEfSe解析を行ったところ、GlcNAc-6S sulfataseを保持する*Bacteroides*属細菌が特異的な増加を示した。このように、*B. bifidum*が*in vivo*でムチン分解性を有することを示すと同時に、ムチン分解によって生じる糖が他の菌に与える影響を明らかにすることができた。

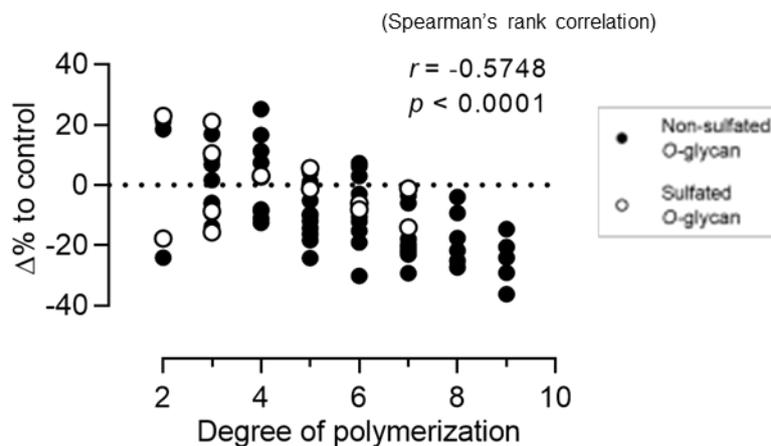


Fig. 3, *Bifidobacterium bifidum*投与群とコントロール群におけるマウス糞便O-glycan各分子種の量的比較

(4) ヒト糞便中の**bbhII**遺伝子と遊離GlcNAc-6Sの相関性

次に、ヒト腸管中でのBbhIIの機能性について調べるため、ヒト糞便中の**bbhII**遺伝子量と遊離GlcNAc-6S量の相関性について検討した。その結果、乳児から採取した糞便サンプル($n = 33$)には有意な正の相関性($p = 0.403, p = 0.0201$)が観察された(Fig. 4)。従って、ヒト腸管におい

ても、*B. bifidum* の BbhII はムチンから GlcNAc-6S を遊離している可能性を示唆していた。一方、成人から採取した糞便サンプル ($n = 18$) では有意な相関性は観察されなかった。この結果は、成人の細菌叢には一般的に *Bacteroides* 属細菌の占有率が高く、GlcNAc-6S が代謝されやすいためだと考えられる。

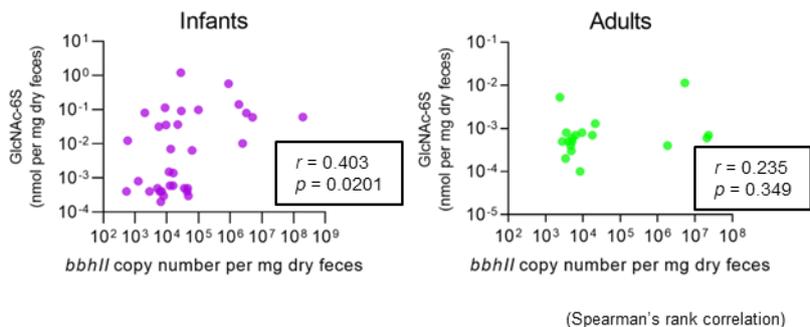


Fig. 4. ヒト糞便中の *bbhII* 遺伝子量と遊離GlcNAc-6S存在量の相関性

(5) *B. bifidum* による CBM 依存的ムチン分解の特異性

B. bifidum の CBM 依存的ムチン分解は BbhII 酵素に限った話ではない。すなわち、*B. bifidum* のムチン分解に関連する膜結合型細胞外酵素のほとんどすべてが、CBM などの糖鎖結合ドメインを含むことが報告されている。一方で、他のムチン分解菌が保有する多くの酵素には CBM がほとんど見られない。Fig. 2 で示された結果が示唆するように、CBM を持たない酵素はムチンへの直接的作用に際して低い活性を示す。これはムチン利用に際して不利に働くと考えられるが、*B. bifidum* 以外のムチン分解者はどのようにこれを克服しているのだろうか。この疑問の答えを求めるべく、各菌のゲノムにコードされる GH と CBM について PARMANOVA 解析を行った。その結果、ムチン構成糖の認識に関与する CBM を多く持つ菌では、GH16 subfamily 3 (GH16_3) を持たない傾向にあることが示された。GH16_3 はムチンからオリゴ糖を切り出すことのできるこれまで知られた中で唯一のエンド型酵素 (endo-*O*-glycanase) である。GH16_3 は多くのムチン分解菌で遺伝子が保存される一方で、*B. bifidum* においては遺伝子が部分欠損し、偽遺伝子化していた。さらに CBM の保有数と割合の大小は、GH16_3 の保有と逆の関係性があることを示していた (Fig. 5)。すなわち、*B. bifidum* と *Clostridium perfringens* の多くの株においては GH16_3 を持たない一方で CBM を多く保持していた。逆に *Akkermansia muciniphila* や *Bacteroides* 属細菌などでは GH16_3 を有し、CBM が少ない。従って、*B. bifidum* や *C. perfringens* の一部は CBM 依

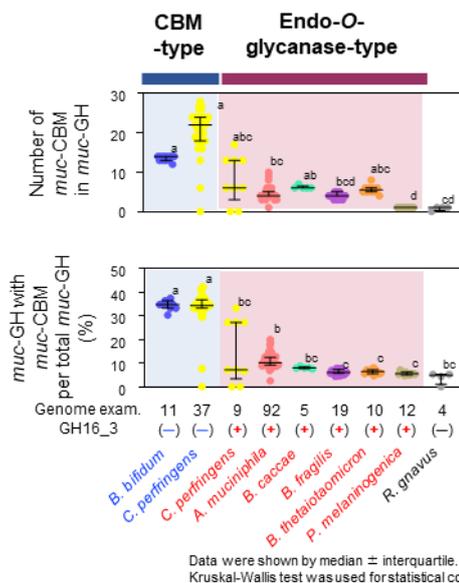


Fig. 5. ムチン分解菌のムチン関連GH (*muc*-GH) およびムチン関連CBM (*muc*-CBM) の保有数(上)と保有割合(下)

存型のムチン分解を行い、一方で *Akkermansia* や *Bacteroides* 属細菌は GH16_3 依存型のムチン分解を行う可能性が示された。遊離の (オリゴ) 糖の分解には CBM の効果が発揮されないという結果 (Fig. 2) はこの仮説を支持している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato 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 ~ 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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤紀彦、荒井萌、山田千早、前洪貴子、吉田彩子、後藤愛那、西山真、伏信進矢、片山高嶺
2. 発表標題 ムチン分解性ビフィズス菌由来スルフォグリコシダーゼの構造・機能解析
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒井萌、加藤紀彦、前洪貴子、山田千早、吉田彩子、西山真、伏信進矢、片山高嶺
2. 発表標題 Bifidobacterium bifidum由来スルフォグリコシダーゼBbhIIの構造・機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会第46回近畿支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤紀彦、後藤愛那、荒井萌、片山高嶺
2. 発表標題 Bifidobacterium bifidumのマウス経口投与による糞便中ムチン糖鎖の分解
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤紀彦
2. 発表標題 Bifidobacterium bifidumによるムチン糖鎖分解と硫酸化糖の代謝
3. 学会等名 ピフィズ菌研究会設立記念第1回シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒井 萌、加藤 紀彦、山田 千早、前浜 貴子、吉田 彩子、西山 真、伏信 進矢、片山 高嶺
2. 発表標題 Bifidobacterium bifidum由来スルフォグリコシダーゼBbhIIの糖鎖結合ドメインの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 加藤紀彦
2. 発表標題 ピフィズフローラ形成に關与するオリゴ糖分解酵素群
3. 学会等名 京都バイオ計測センター研究交流会(招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 加藤紀彦
2. 発表標題 宿主由来オリゴ糖利用によるピフィズ菌叢形成メカニズム
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 加藤紀彦
2. 発表標題 ビフィズス菌のオリゴ糖資化・代謝メカニズム
3. 学会等名 おかやまバイオアクティブ研究会第55回シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020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
研究 分担 者	伏信 進矢 (Fushinobu Shinya) (00302589)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授 (12601)	

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		
オーストラリア	The University of Western Australia		
オランダ	Wageningen University		