

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08419

研究課題名(和文) 胃・十二指腸に特異的な腺粘液の腸内細菌叢による宿主への還元機構

研究課題名(英文) Feedback mechanism for host by microflora degradation of gastro-duodena gland mucin

研究代表者

川久保 雅友 (Kawakubo, Masatomo)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：70397305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胃・十二指腸にのみ豊富に含まれる腺粘液が胃の下流の腸内細菌によって分解され、栄養として利用されることで、腸内細菌の作り出した代謝産物が形を換えて宿主に還元されているか、腺粘液に特徴的な糖鎖構造である GlcNAcを欠損させたマウスおよび野生型マウスの腸内細菌叢の相違を調べることから解明を試みた。

その結果、GlcNAcを分解する酵素を有する腸内細菌が野生型マウス盲腸内においてのみ検出された。また、糖鎖分解能を有すると報告されている GlcNAc依存性の細菌叢が、野生型マウス盲腸内に比べて GlcNAc欠損下で大幅に減少することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管の内部を覆っている糖、蛋白質の複合体である粘液は、栄養源として利用可能で有り、分解する酵素を腸内細菌の一部が有している。腸内細菌叢は宿主にとって有用な成分を作っていることは広く知られ、この中に粘液中に依存菌種も含まれている。食事・薬物の摂取などにより腸内細菌叢の構成菌種は影響を受けるものの代謝産物が共通することがわかっているが、ムチン依存菌である *Akkermansia muciniphila* は肥満や糖尿病との関連性が指摘されている。宿主の粘液成分の変化がムチン分解菌群の変化として宿主の健康に影響を与えている可能性が考えられ、すなわち粘液環境の改善を通して健康維持をはかれる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Whether the gland mucin, which is abundant only in the stomach and duodenum, is degraded by intestinal bacteria and used as nutrition, and whether metabolites produced by intestinal bacteria are returned to the host in a transformed form. We attempted to elucidate this by examining differences in the intestinal microbiota of mice lacking GlcNAc, a glycan structure characteristic of the gland mucin, and wild-type mice. We found that intestinal bacteria possessing GlcNAc-degrading enzymes were detected only in the cecum of wild-type mice. We also found that the GlcNAc-dependent bacterial community, which has been reported to have glycoside hydrolase activity, was reduced in the cecum of the GlcNAc-deficient mice compared to that of the wild-type mouse.

研究分野：実験病理学

キーワード：胃腺粘液 糖鎖 GlcNAc 腸内細菌叢 マウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

体表の内面を覆う粘膜は、粘液 (ムチン)により物理的、化学的、生物的な刺激から守られている。特に胃・十二指腸の粘液は、自己のタンパク消化酵素から粘膜上皮そのものを保護している。胃ムチンは分泌量も多いため、大量に消化管下部に流れて腸内細菌の栄養源となっていることが考えられる。粘液を栄養として利用するムチン分解能を有する腸内細菌が知られているが、ムチンを単独の栄養源として利用する *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*)が発見され注目されている (Derrien M. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004)。*A. muciniphila* は、ヒトを始め多くの生物種の消化管内に常在菌として認められ、肥満や糖尿病との関連性が指摘されている (Plovier H. *Nat Med* 2015)。

ムチン上で糖鎖は非常に密に詰まっているため元来分解されにくいですが、胃腺粘液の末端は特徴的な糖鎖結合を持つ GlcNAc によりさらに分解を受けにくくなっている。胃腺粘液の GlcNAc の末端を分解する腸内細菌が分泌する酵素は、悪玉菌であるウエルシュ菌から GlcNAc 1-4Gal として2糖をムチンから遊離させる特異なエンド-β-ガラクトシダーゼとして初めて同定された (Ashida H. *J Biol Chem* 2001)。その後 GlcNAc 1-4Gal 構造に特異的に作用し GlcNAc 単糖として分解する酵素 -N-アセチルグルコサミニダーゼがウエルシュ菌、善玉菌であるピフィズス菌の2例報告され (Fujita M. *J Biol Chem* 2011, Shimada Y. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015)、これら GlcNAc を単糖として分解する酵素は、いずれも共通した glycoside hydrolase family 89 (GH89)に含まれる酵素であった。GH89 はムチン分解性の腸内細菌のゲノム中には候補遺伝子が見られるものの、いまだ不明な点が多く解析を待たれている特異な酵素である。ウエルシュ菌、ピフィズス菌に属する菌種の一部から GlcNAc を分解する酵素が単離され、またムチンを単独の栄養源として要求する *A. muciniphila* にもゲノム中にムチン分解の候補遺伝子が数多く見られるものの、腺粘液の末端である GlcNAc 分解・利用に関してはほとんど報告がない。GH89 family は、その他のムチン分解菌ゲノム内に存在する可能性も指摘されている。

### 2. 研究の目的

胃・十二指腸に特徴的な腺粘液の末端構造である GlcNAc の分解を起点とした腸内細菌のカスケードを解明するために、GlcNAc 欠損マウスと野生型マウスの腸管内細菌叢を比較することから、腺粘液存在下に特異的に見出すことができる腸内細菌叢を明らかにする。また、腺粘液を単独の栄養源として要求する腸内細菌を同定し、GH89モチーフを持つ新たな遺伝子の情報を得る。さらに、GlcNAc 要求性腸内細菌の代謝産物に関連した宿主にとっての有用性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

ヒト胃腺粘液の糖鎖末端に付加されている GlcNAc を同様に胃腺粘液に持つマウスは、ヒトの腸内細菌叢と同様に GlcNAc 分解能を有する腸内細菌が含まれる。野生型マウスでは GlcNAc を起点とした腸内細菌叢が存在するのに対し、GlcNAc 欠損マウスでは該当する細菌叢が極めて少ない、あるいは存在しないと予想される。そこで野生型で GlcNAc を胃粘液に含むマウスおよび GlcNAc を欠損したマウスを用いて両者の腸内細菌叢に関して以下の研究を行った。

#### (1): GlcNAc 欠損マウスおよび野生型マウスの作成

胃腺粘液以外の背景を同一にするために、腸内細菌の入手用に GlcNAc 欠損マウスおよび同一環境下で飼育した野生型マウスを交配し、胃腺粘液に GlcNAc 欠損形質および野生型形質を持つ同腹個体を作成した。離乳後 GlcNAc 欠損形質および野生型形質は PCR により確認し、同腹個体でそれぞれ3匹以上が得られた兄妹について腸管内容物を採取に用いた。

#### (2): 腸管内容物の採取および核酸抽出

GlcNAc 欠損形質および野生型形質の同腹マウスは、離乳後、同一ケージ内にて5週齢まで飼育し、小腸内容物、盲腸内容物を採取し、直ちに-80℃にて凍結保存した。採取の際、GlcNAc 欠損形質および野生型形質についてさらに胃所見で確認した。腸管内容物より、腸内細菌由来の genomic DNA を対象に MetaVx Library Preparation kit, full-length 16S Library Preparation kitにて調製し、Agilent 2100 Bioanalyzerにて純度を確認した。総 RNA は TRIzol Reagent (Invitrogen)および RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて抽出し、Agilent 2100 Bioanalyzerにて純度を確認した。

#### (3): 16S rDNA 超可変領域に基づく細菌叢の推定

腺粘液に関連のある細菌叢を推定するため、GlcNAc 欠損マウスおよび野生型マウスの小腸内

細菌叢および盲腸内細菌叢より抽出した全 DNA を対象として 16S rDNA 超可変領域 V3 および V4 を PCR にて増幅し、Illumina MiSeq を使用して 16S rDNA 超可変領域 V3 および V4 の細菌叢の塩基配列を得た。得られた配列データは operational taxonomic units (OTUs) にグループ化し菌種推定、多様性多様性の解析を行った。

(4): 16S rDNA 全塩基配列に基づく細菌叢の同定

16S rDNA 細菌叢解析の結果から、盲腸内細菌叢には小腸内細菌叢がすべて内包されることが判明したため、腺粘液に関連のある細菌種を同定するため、GlcNAc 欠損マウスおよび野生型マウスの盲腸内細菌叢の全 DNA を対象として 16S rDNA 領域を PCR にて増幅し、PacBio Sequel を使用して 16S rDNA の細菌叢の塩基配列を得た。得られた配列データは OTUs にグループ化し菌種同定、多様性の解析を行った。

(5): 網羅的遺伝子発現解析

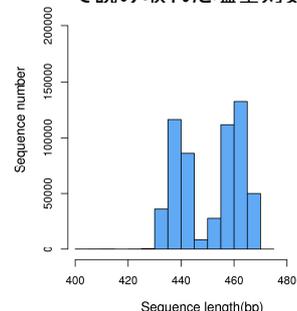
GlcNAc 欠損マウスおよび野生型マウス盲腸内細菌叢より抽出した RNA は ProtoScript II Reverse Transcriptase で逆転写を行い、得られた cDNA は PCR にて増幅した後、Illumina HiSeq により配列を決定した。読み取れた塩基配列の Open reading frames (ORFs) をデータベース上で相同性検索を行い GlcNAc 欠損マウスおよび野生型マウス腸内細菌の網羅的発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1): GlcNAc 欠損マウスおよび野生型マウスの表現型

PCR による a4gnt 遺伝子解析において同腹兄妹で GlcNAc 欠損および野生型形質を示すマウスが各々 3 匹以上得られた交配群について、腸管内容物採取時の胃粘膜についても所見通りに表現型を確認したところ、GlcNAc 欠損では特徴的な幽門部周辺の肥厚が観察され、一方、野生型では同箇所肥厚が認められず PCR と表現形質が一致することが確認できた。同腹個体で生育環境が同一であることから、胃腺粘液形質の相違のみに依存した腸内細菌叢の変化の評価が可能と考えられる。

図 1 次世代シーケンサで読み取れた塩基対数



(2): 腸管内容物より得られた核酸純度

同腹兄妹の同一表現型の個体の小腸領域および盲腸より得られた内容物を解凍後、同一条件の 3 検体をプールし、次世代シーケンサ用のサンプルを調製したところ、16S rDNA 超可変領域 (図 1)、16S rDNA 全塩基配列いずれも解析に十分な塩基配列を読み取ることが可能であった。また、採取した RNA は cDNA の作製に対し問題になる分解は、生じていなかった。

(3): 16S rDNA 超可変領域配列解析より得られた細菌叢

16S rDNA 超可変領域配列を解析した OTU グループから類推された細菌叢は、属レベルに比べ種レベルで同定された菌がむしろ少なかった。16S rDNA 超可変領域配列の同定精度は、*Akkermansia* のように属する菌種が少ない菌属では不十分であることが示唆された。一方、小腸から得られた菌種は盲腸由来に内包されるものであり、空腸・回腸全域から内容物を採取した場合でも、下流域である盲腸に全細菌叢が含まれることが判明した。

多様性解析の結果から、菌種の多様性は GlcNAc 欠損の腸内環境では増加する傾向がみられた。これは単一のオリゴ糖などを多く

表 1 α多様性に関連した各インデックスを示す

摂取すると、腸内細菌叢のバリエーションが減少することが知られていることと一致し、GlcNAc 欠損では野生型に対し分解利用できる糖鎖が乏しくなることに起因すると考えられる。

Group		ACE	chao1	shannon	simpson
野生型	小腸	179	175	4.9	0.95
	盲腸	206	205	6.2	0.98
4GnT 欠損	小腸	191	192	4.3	0.91
	盲腸	229	229	6.7	0.98

(4): 16S rDNA 全塩基配列解析より得られた細菌叢

16S rDNA 全塩基配列から得られた OTU グループでは、菌属よりさらに菌種まで同定が可能であった。すなわち 16S rDNA 超可変領域配列解析では単一の菌種として同定できなかった菌種が明確になるものもあり、*Akkermansia* に含まれる新たな菌種が野生型では全菌種の 10% を超える含有量で検出され、GlcNAc 欠損では野生型の 1/3 に減少しており、GlcNAc 分解系に大きく関与していることが示唆された。他に粘液糖鎖分解に関与していると考えられている 2 菌種が野生型に比べて GlcNAc 欠損で明らかに低下していた。胃粘液の特徴的な腺粘液にの糖鎖構造に依存する糖分解能を有する菌種の存在が明白になった。

(5): GlcNAc 特異的遺伝子発現

2つのマウスの盲腸内より得られた細菌叢の mRNA を用いて発現遺伝子の比較解析を行ったところ、既報のウエルシュ菌由来の GlcNAc 分解に関与する酵素遺伝子が、野生型マウス盲腸内に特異的に発現が見られ、GlcNAc マウス盲腸内からは検出されなかった。このことから、GlcNAc による胃粘液糖鎖の変化が下部消化管の腸内細菌叢に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、glycoside hydrolase family の総数は GlcNAc 欠損により減少していたが、GH89 モチーフを有する遺伝子については、発現と結びつけられる結果は得られなかったものの、同定不能の GH ファミリーに由来する遺伝子産物がおよそ 6 万リード残されていた。Akkermansia 菌種は野生型において菌含有量が全菌種の 10% を超えるにもかかわらず、相同性検索から Akkermansia 由来の発現遺伝子がほとんど同定されず、未知の Akkermansia 菌種であるため、データとして配列が登録されていないことが原因と考えられ、同定不能の GH ファミリーに GH89 モチーフを有する遺伝子が含まれている可能性が考えられ、この酵素遺伝子の配列データがさらに蓄積されれば解析が可能になると思われる。さらに GH89 family による分解を起点としたその他 glycoside hydrolase が関与する、GlcNAc 欠損による細菌叢の変化が生体に影響を与えるような代謝産物の変化に関して、得られた発現遺伝子の両マウス間における機能解析も必要と考えられる。

以上の得られた結果は、現在学術雑誌への投稿に向けて論文を作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Junichi, Kawakubo Masatomo, Fujii Chifumi, Arisaka Nobuhiko, Miyashita Masaki, Sato Yoshiko, Komura Hitomi, Matoba Hisanori, Nakayama Jun	4. 巻 118
2. 論文標題 Cholestenone functions as an antibiotic against Helicobacter pylori by inhibiting biosynthesis of the cell wall component CGL	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2016469118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2016469118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masatomo Kawakubo, Hitomi Komura, Yukinobu Goso, Motohiro Okumura, Yoshiko Sato, Chifumi Fujii, Masaki Miyashita, Nobuhiko Arisaka, Satoru Harumiya, Kazuhiro Yamanoi, Shigenori Yamada, Shigeru Kakuta, Hiroto Kawashima, Michiko N Fukuda, Minoru Fukuda, Jun Nakayama	4. 巻 67
2. 論文標題 Analysis of A4gnt Knockout Mice Reveals an Essential Role for Gastric Sulfomucins in Preventing Gastritis Cystica Profunda	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 759-770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/0022155419860134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川久保 雅友, 小村 仁美, 五艘 行信, 奥村 征大, 佐藤 佳子, 藤井 千文, 宮下 聖基, 有坂 宣彦, 春宮 覚, 山ノ井 一裕, 山田 重徳, 角田 茂, 川島 博人, 福田 道子, 福田 稯, 中山 淳
2. 発表標題 Gastritis Cystica Profunda の発生抑制における胃スルホムチンの役割の解明
3. 学会等名 第60 回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗ピロリ菌活性を有するコレステロール類似物質	発明者 中山淳, 川久保雅友	権利者 国立大学法人信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/3143	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

信州大学医学部医学科・大学院総合医理工学研究科医学系専攻医学分野 分子病理学教室  
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2byori/index.html>  
EurekaAlert  
[https://www.eurekaalert.org/pub\\_releases/2021-04/su-csa042721.php](https://www.eurekaalert.org/pub_releases/2021-04/su-csa042721.php)  
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2byori/work.html>

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
---------	---------