

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05801

研究課題名(和文) ビフィズス菌の硫黄獲得機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of sulfur-assimilation mechanism in bifidobacteria

研究代表者

和田 大 (WADA, Masaru)

摂南大学・農学部・教授

研究者番号：00301416

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)：本研究はビフィズス菌のCys/Met代謝の全容解明を目指しており、これまでに *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A (105-A株) のCys要求性はMetで代替可能であり、MetからCysへ代謝する逆流硫黄経路を有することを示している。

105-A株の0509, 0510遺伝子を大腸菌で発現させて、組換えタンパク質の機能解析を行い、組換え0509は細菌に見られるO-acetylserine dependent cystathionine- γ -synthase (EC 2.5.1.134)であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビフィズス菌は人の腸内細菌叢における主要構成菌群の一つであり、大腸内に生息する。しかし大腸内は小腸と比べ貧栄養な環境であるため、限られた栄養源を効率的に取得・利用する必要がある。ビフィズス菌がどのように栄養源を獲得・利用しているかの栄養代謝への理解は非常に重要となる。これまでビフィズス菌の含硫アミノ酸代謝に関する知見はほとんどなかった。本研究はビフィズス菌の含硫アミノ酸代謝経路の全容解明を目的として実施し、シスタチオニン- γ -シントラーゼなどの含硫アミノ酸代謝酵素の大腸菌発現に成功した。また、組換え酵素の性質解明も行った。これにより、本研究の目的に近づくことができた。

研究成果の概要(英文)：Cysteine and methionine metabolism of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A have been investigated in this study. Putative orfs, BL105A_0509 and 0510, were expressed in *E. coli*, and then the recombinant proteins were characterized. Recombinant 0509 protein showed cystathionine forming activity from O-acetylserine and homocysteine. Thus, BL105A_0509 encodes O-acetylserine dependent cystathionine- γ -synthase (EC 2.5.1.134), which is commonly found in bacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌 含硫アミノ酸 システイン メチオニン シスタチオニン

1. 研究開始当初の背景

ヒトの大腸内に生息するビフィズス菌は、腸内細菌叢における主要構成菌群の一つであり、宿主に対して健康増進効果を持つことが知られている(Azad MA *et al.*, 2018)。健康増進効果は乳製品などでプロバイオティクスとしての利用で多く見られる。しかし、ビフィズス菌は小腸と比べ貧栄養な環境である大腸内で他の腸内細菌と栄養獲得競争を行いながら限られた栄養源を効率的に取得・利用する必要がある。

様々な研究からビフィズス菌が糖質や食物繊維を用いて効率的に増殖することは知られているが(Gibson GR *et al.*, 1995)、アミノ酸代謝に関してはほとんど調べられていないため、ビフィズス菌のアミノ酸代謝を調べる必要があった。ビフィズス菌の生育には含硫アミノ酸である Cysteine が必須栄養源であると考えられていたが、ゲノム解析から一部のビフィズス菌株で Cysteine 以外の含硫アミノ酸を代謝する酵素をコードする遺伝子の存在が示唆された(図1)。研究開始当初はビフィズス菌の含硫アミノ酸代謝に関してはほとんど調べられていなかった。そのためビフィズス菌の含硫アミノ酸代謝経路の全容解明単一硫黄源として研究を開始した。本研究にはヒト由来で、かつ遺伝子操作が容易である *Bifidobacterium longum* 105-A (以下 105-A) を用いた(Hirayama *et al.*, 2012)。

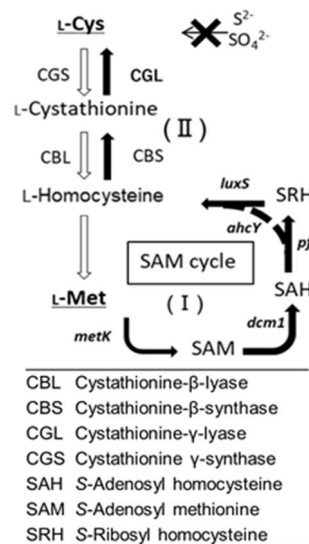


図1 *B. longum* 105-A における推定含硫アミノ酸代謝経路

2. 研究の目的

本研究の目的はビフィズス菌におけるシステイン、メチオニン代謝の全容解明であり、特に逆流硫黄経路のホモシステイン以降の2つの反応に注目して酵素および遺伝子の同定を行う。

ビフィズス菌の健康増進効果を十分に発揮するためには、ビフィズス菌がヒト大腸内で定着、増殖する必要があるが、そのメカニズムは十分に明らかになっていない。増殖には栄養が必要であるが、ビフィズス菌の栄養獲得機構の研究は、オリゴ糖などの糖質に偏っており、アミノ酸代謝の知見がそもそも不足している。本研究でビフィズス菌の含硫アミノ酸代謝の全容が明らかとなれば、ビフィズス菌の栄養代謝に関する理解が深まり、基礎・応用の両面で波及効果も大きい。

3. 研究の方法

105-A の推定シスタチオニン-β-シターゼ (CBS) 遺伝子およびシスタチオニン-γ-リアーゼ (CGL) 遺伝子産物の機能解析を行った。まず、推定 CBS 遺伝子である BL105A_0509 を pET システムを用いて大腸菌に組み込み、その後 IPTG によるタンパク質発現誘導を行った。His タグを利用して組換えタンパク質を精製後、精製酵素による酵素反応を行い、アミノ酸標識試薬である 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-D-leucinamide (FDLA)を用いてアミノ酸をラベル化し、HPLC で反応生成物の分析を行った。

また、推定 CGL 遺伝子である BL105A_0510 も同様の方法で組換え酵素を調製して、活

性をしらべた。さらに推定シスタチオン-β-リナーゼ (CBL) と考えられた BL105A_1451 についても同様に検証した。

4. 研究成果

0509 遺伝子産物の酵素反応実験ではホモシステインと *O*-アセチルセリンからシスタチオニンの生成を確認した。よって 0509 遺伝子産物は CBS であることが確認できた(図 2)。本組換え酵素はセリンを基質としなかったことから、0509 遺伝子産物は細菌に一般的に見られる *O*-acetylserine dependent cystathionine-β-synthase (EC 2.5.1.134, Fig. 2)であることが明らかになった。

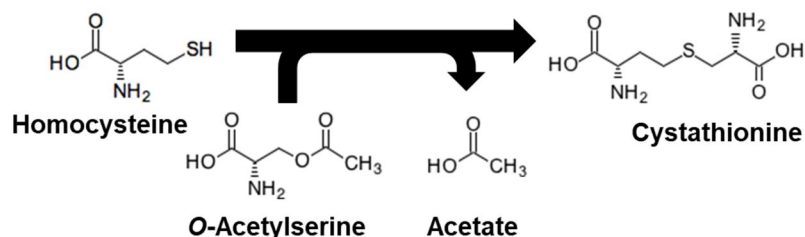


図 2 シスタチオン-β-シンターゼ反応

一方 1451 遺伝子産物の酵素反応実験ではシスタチオンが切断され、ホモシステインが生成したのが確認された。よって 1451 遺伝子産物は CBL であることが確認できた(図 3)。しかし 1451 産物の活性は微弱であり、反応条件が適切でない可能性もある。

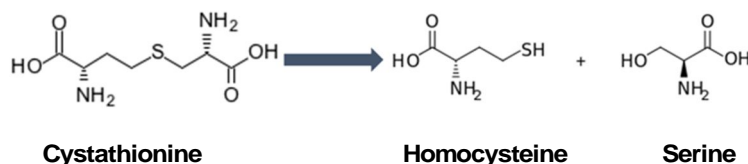


図 3 シスタチオン-β-リナーゼ反応

一方、シスタチオン-γ-リナーゼ(CGL)遺伝子の候補である BL105A_0510 遺伝子産物は有意な cystathionine-γ-lyase 活性を示さなかった。この原因については解明できなかったが、発現条件が適していない可能性もある。

本研究ではビフィズス菌の含硫アミノ酸代謝酵素の大腸菌発現に成功し、組換え酵素の性質解明にも初めて成功した。これにより、本研究の目的である「ビフィズス菌の含硫アミノ酸代謝の代謝の全容解明」に近づくことができた。

引用文献

Md. Abul Kalam Azad, Manobendro Sarker, Tiejun Li, Jie Yin (2018) Probioticspecies in the modulation of gut microbiota: An overview. *Biomed Res int.*, e9478630.

G R Gibson, M B Roberfroid (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, **125**:1401-1412.

Y. Hirayama, M. Sakanaka, H. Fukuma, H. Murayama, Y. Kano, S. Fukiya, A. Yokota (2012)
Development of a double-crossover markerless gene deletion system in *Bifidobacterium longum*:
functional analysis of the α -galactosidase gene for raffinose assimilation. *Appl. Environ. Microbiol.*,
78:4984-4994.

M. Wada, S. Fukiya, A. Suzuki, N. Matsumoto, M. Matsuo, A. Yokota (2021) Methionine utilization
by bifidobacteria: possible existence of a reverse transsulfuration pathway. *Biosci Microbiota Food
Health*, **40**:80-83.

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 Masaru WADA, Satoru FUKIYA, Azusa SUZUKI, Nanae MATSUMOTO, Miki MATSUO, Atsushi YOKOTA	4. 巻 40
2. 論文標題 Methionine utilization by bifidobacteria: possible existence of a reverse transsulfuration pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 80-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12938/bmfh.2020-031	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田 大 宮森 那知 吹谷 智 横田 篤
2. 発表標題 ビフィズス菌シスタチオン代謝酵素の大腸菌内発現と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮森 那知 松本 菜々恵 吹谷 智 横田 篤 和田 大
2. 発表標題 Bifidobacterium longum 105-Aが有する 逆流硫黄経路を構成する 酵素遺伝子の同定と機能検証
3. 学会等名 乳酸菌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮森 那知 松本 菜々恵 吹谷 智 横田 篤 和田 大
2. 発表標題 Bifidobacterium longum 105-Aのシステイン/メチオニン代謝に関する酵素遺伝子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮森那知, 松本 菜々恵, 吹谷 智, 横田 篤, 和田 大
2. 発表標題 Bifidobacterium longum 105-Aが有する逆流硫黄経路を構成する酵素遺伝子の同定と機能検証
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 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	吹谷 智 (FUKIYA Satoru) (10370157)	北海道大学・農学研究院・教授 (10101)	

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