

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02116

研究課題名（和文）ミクロの視点から解明する乳児期の菌叢形成メカニズム：酵素機能解析の新展開

研究課題名（英文）Enzymatic insight into the microbiota formation in infant guts

研究代表者

片山 高嶺（Katayama, Takane）

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70346104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：乳児期における腸内菌叢の成熟は、免疫の発達に大きく関与する。申請者は、母乳栄養児の腸管におけるビフィズス菌形成には、人乳中で3番目に多く含まれるオリゴ糖成分（母乳オリゴ糖）が関与していることを明らかとしてきた。本研究では、腸内細菌酵素の機能に差異を生じさせる数アミノ酸残基に着目し、細菌代謝・細菌酵素といったミクロの観点から菌叢形成過程というマクロの観点を理解すること試みた。その結果、腸内細菌叢の形成過程を分子レベルで理解する上で、また腸内細菌メタゲノムデータを詳細に解析をする上で新しいフレームワークを提供することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌およびその代謝物が宿主の健康に大きく関与することが知られている一方で、腸内細菌叢の形成機構については未解明な点が多く残されている。本研究では、腸内細菌が有する酵素のユニークな機能的差異に着目し、その差異が菌叢形成にどのような影響を及ぼすのかについて、微生物代謝および酵素機能の観点から明らかとした。腸内細菌の菌叢解析（菌種組成解析）やメタゲノム解析（環境DNA全解析）が行われているが、腸内細菌が有する酵素（代謝能）は、菌種レベルのみならず菌株レベルで異なっていることから、菌叢形成機序を理解するためには、より詳細な酵素機能の解析やインフォマティクス解析が必要であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Gut microbiota formed during infancy significantly influences immune development. We have elucidated that the oligosaccharides abundantly present in human milk (human milk oligosaccharides) are responsible for the formation of bifidobacteria-rich microbiota in the gut of breastfed infants. This study aimed to understand how naturally diversified amino acid replacements in bacterial enzymes affect the formation of gut microbiota. As a result, we succeeded in establishing a framework that enables us to understand the molecular basis underlying gut microbiota formation and to more precisely analyze gut microbial metagenomic data.

研究分野：応用微生物学

キーワード：共生 ムチン0-グリカン ヒト母乳オリゴ糖 ビフィズス菌 酵素機能解析

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢およびその代謝物は、宿主の健康維持や疾患の発症に大きく関与することが明らかとなってきたが、最も基本的な菌叢形成のメカニズムについては未解明な点が多く残されている。これは、腸内細菌の有する多様な代謝能についての理解が進んでいないこと、および腸内細菌生態学の理解が進んでいないことに大きく起因している。本研究では、宿主の産生する糖質(ヒト母乳オリゴ糖やムチン糖鎖)の腸内細菌代謝を分子レベルで理解すること、また、その糖質利用を介した生態学的解析を行うことで、菌叢形成メカニズムを理解することを試みた。

2. 研究の目的

・ヒト母乳オリゴ糖に関して

一般に、乳児期における腸内菌叢の成熟は、免疫の発達に大きく関与することが知られている。申請者はこれまでの研究において、人乳に3番目に多く含まれるオリゴ糖成分(母乳オリゴ糖)がビフィズス菌の選択的増殖因子として機能することで乳児腸管内においてビフィズスフローラが形成されることを明らかとしてきた。この過程で、菌叢形成メカニズムというマクロ的な視点の解明には、「数アミノ酸残基の差異から生じる細菌代謝能の変化」というミクロ的な視点が不可欠であることが示唆された。すなわち、わずかなアミノ酸残基の違いが、そのホモログ酵素に異なる生理機能を付与し、それが実際の細菌叢形成に関与している可能性が示唆された。そこで本課題では、細菌の糖代謝関連遺伝子(酵素)特にヒト母乳オリゴ糖トランスポーターを材料として乳児期の菌叢形成メカニズム解析を更に進めると共に、それら酵素の機能に差異を生じさせる数アミノ酸残基に着目し、細菌代謝・細菌酵素(ミクロ)から菌叢形成過程(マクロ)を理解することを試みた。

・ムチン糖鎖に関して

離乳後は、食餌成分に含まれる難消化性糖質が腸内細菌の主な栄養源となるとされてきたが、それ以外にも、腸管に多量に分泌される糖タンパク質であるムチンが腸内細菌の栄養源として利用されていることが明らかとなってきた。しかしながら、ムチン糖鎖の分解機序については不明な点が多く残されている。本課題では、硫酸化ムチン糖鎖の分解に関わる新規な酵素を単離同定し、その構造機能解析を行うことや、ヒトサンプルやマウスサンプルを解析することで、当該酵素が腸管内定着においてどのような役割を果たしているかについて明らかとすることを試みた。

また、以上の成果を統合することで、腸内細菌叢や腸内細菌メタゲノムの解析には、相同性によるタンパク質機能のアノテーションのみならず、数アミノ酸残基(signature sequence)に着目した詳細な分子機能予測に基づいたインフォマティクス解析の必要性があることを提示すると共に、今後のプロバイオティクス・プレバイオティクス研究開発の分子基盤を提供することを試みた。

3. 研究の方法

母乳サンプルおよび乳児糞便サンプルは、京都府内の助産院の協力を得て回収した。成人糞便サンプルはボランティアを募って大学内において回収した。これらの研究は、京都大学医の倫理委員会で承認されている(R0046)。ヒトミルクオリゴ糖は蛍光ラベル後に HPLC を用いて、ムチン糖鎖はβ-脱離後に完全メチル化を行い MALDI-TOF-MS を用いて解析した。16S rRNA 遺伝子による菌叢解析は定法に従って行った。組換え酵素は大腸菌を宿主として発現させ、定法に従って精製した。細菌の遺伝子破壊は、複製不能プラスミドを用いたシングルクロスオーバーもしくは温度感受性プラスミドを用いたダブルクロスオーバーにて行った。インフォマティクス解析は国立遺伝学研究所のサーバーを利用して行った。X線回折実験は、Spring-8 において行った。

4. 研究成果

・ヒト母乳オリゴ糖に関して

以前の研究において単離同定していた母乳オリゴ糖トランスポーター(フコシルラクトーストランスポーター)のホモログについて系統樹解析を行ったところ、4つのクラスターに分類されることが明らかとなり、そのクラスター間ではX線結晶構造解析の結果から明らかとなった基質認識に関わるアミノ酸残基がそれぞれ異なって保存されていた。そこで、未解析であった2つのクラスターに属するホモログについて解析を進めた。その結果、4つのホモログは、重複しつつも少しずつ異なる特異性を有し、様々なレポーターの母乳オリ

ゴ糖取込みに関わるということが明らかとなった。

また、母乳オリゴ糖の最も主要なコア構造であるラクト-*N*-テトラオースのトランスポーターを同定すると共に、当該トランスポーターは *Bifidobacterium* 属内において 6 種類程度のバリエーションとして存在しており、たった 3 アミノ酸残基が違っただけでラクト-*N*-テトラオース取込み活性が大きく異なることを見出した。次世代シーケンサーを用いたバリエーション解析および公共データベースを用いたメタゲノムデータマイニングを行ったところ、ラクト-*N*-テトラオース取込み能の高いバリエーションは授乳期にのみ濃縮されており、離乳後にはそのような傾向が無くなるということが明らかとなった。

以上の結果は、ゲノム解析やメタゲノム解析を行う上では、アミノ酸配列の相同性によるアノテーションだけでは不十分であることを示唆しており、腸内細菌代謝やそれに伴う菌叢形成メカニズムを理解するには、基質認識に関わる重要なアミノ酸残基 (signature sequence) を基にした詳細なインフォマティクス解析が必要であることを示唆している。

また、上記以外に、ラクト-*N*-テトラオースの分解に関わる β -ガラクトシダーゼの X 線結晶構造解析、および母乳オリゴ糖分解遺伝子の発現制御に関わる転写調節因子 NagR の解析も行った。

生態学は、もともと肉眼あるいは低倍率の顕微鏡で観察可能な生物を対象に発展してきた学問であるが、近年、腸内細菌叢の形成機構にもその理論が応用可能であることが明らかとなってきている。本課題では、乳児糞便から頻りに単離される 4 種の *Bifidobacterium* 属細菌を利用して生態学的な解析を試みた。つまり、母乳オリゴ糖利用時における先住効果 (ある環境に導入される種の順序が、最終的なコミュニティ形成に与える影響) を調べた。その結果、最も母乳オリゴ糖利用能の低い菌種である *Bifidobacterium breve* が早い段階で環境に導入された場合に、他の *Bifidobacterium* 属細菌の母乳オリゴ糖分解物、特に遊離したフコースを利用することで (横取りすることで) コミュニティの優占種となることが明らかとなった。この *in vitro* 実験において見られた現象が実際の環境下 (ヒト腸内) においても起こっているかを確認するために、公共データベースに登録された乳児メタゲノムデータを経時的に解析したところ、やはり *B. breve* の先住効果が確認された。低体重出産児においては、腸内細菌叢の発達が遅れることが知られており、一部においては *Bifidobacterium* 属細菌を用いた介入が行われているが、この介入効果をより高める上で重要な知見を提供したと考えている。

・ムチン糖鎖に関して

腸管上皮は 1 mm 程度の厚さの粘液に覆われており、この粘液の主成分はムチンと呼ばれる巨大な糖タンパク質である。ムチン糖鎖は大腸下部にいくほど硫酸化されており、この硫酸化は腸内細菌によるムチン糖鎖分解を防ぐ機能があるが、一部の腸内細菌はスルファターゼと呼ばれる酵素を利用して硫酸基を取り除くことで、ムチン糖鎖を更に分解することが可能である。これまで、硫酸化された糖鎖の分解酵素としてはスルファターゼのみが知られていたが、本課題においてスルフォグリコシダーゼと呼ばれる硫酸化糖 (硫酸化 *N*-アセチルグルコサミン) に作用する酵素も関与していることが明らかとなった。すなわち、*Bifidobacterium bifidum* にスルフォグリコシダーゼ活性を見出し、当該酵素の構造機能解析を行うと共に、ヒト糞便サンプルに遊離の硫酸化 *N*-アセチルグルコサミン (ムチン糖鎖に結合した状態ではなく、遊離状態で存在する糖) が検出されること、また乳児糞便サンプルにおいて、遊離の硫酸化 *N*-アセチルグルコサミン量とスルフォグリコシダーゼ遺伝子量が正相関していることを見出した。また *B. bifidum* 野生株およびスルフォグリコシダーゼ遺伝子破壊株をそれぞれ単独定着させたマウスの盲腸内容物や糞便ムチン糖鎖の解析を行うことで、硫酸化ムチン糖鎖におけるスルフォグリコシダーゼの重要性を明らかとした。さらに、スルフォグリコシダーゼの N 末端側に存在する糖質結合モジュールが、本酵素による硫酸化ムチンからの効率的な硫酸化 *N*-アセチルグルコサミン遊離に極めて重要な役割を果たすことを見出した。ムチン糖鎖を分解するものとして良く知られている腸内細菌ゲノムを統計学的に解析したところ (PERMANOVA) ゲノム上における糖質結合モジュールの保有率には、エンド-*O*-グリカナーゼ遺伝子の有無が最も高い効果を及ぼしていることが明らかとなった。エンド-*O*-グリカナーゼは、細胞外分泌酵素としてムチン糖鎖の内部構造に作用し、オリゴ糖を遊離させる酵素である。すなわち、糖質結合モジュールをゲノム上に多く有する腸内細菌は、当該モジュールを利用してムチン糖鎖に直接結合して糖鎖を分解する一方で、エンド-*O*-グリカナーゼを有する腸内細菌はムチン糖鎖に直接結合する必要はなく、遊離してきたムチン糖鎖を捕捉して分解利用していることが推察された。なお、*B. bifidum* ゲノム上には偽遺伝子化したエンド-*O*-グリカナーゼの痕跡が見いだされた。

また、上記以外に、*B. bifidum* ゲノム上の糖質加水分解酵素のうち機能が知られていなかった BbhIV が、ムチン糖鎖のコア 2 構造およびコア 4 構造に見られる分岐 *N*-アセチルグルコサミンに作用する特異的酵素であることを見出した。BbhIV は糖質分解酵素ファミリー 84 に属しており、これまで本ファミリーの酵素は *O*-GlcNAc タンパク質 (真核生物においてシグナル伝達に関わる糖鎖修飾) を基質としているとされてきたが、本報告により、その起源がムチン糖鎖分解酵素であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katoh Toshihiko, Yamada Chihaya, Wallace Michael D, 他13名, Nishiyama Makoto, Kimura Ikuo, Stubbs Keith A., Fushinobu Shinya, Katayama Takane	4. 巻 -
2. 論文標題 A bacterial sulfoglycosidase highlights mucin O-glycan breakdown in the gut ecosystem	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	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） 10.1038/s41589-023-01272-y	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 該当する
1. 著者名 Yamada Chihaya, Katayama Takane, Fushinobu Shinya	4. 巻 86
2. 論文標題 Crystal structures of glycoside hydrolase family 136 lacto-N-biosidases from monkey gut- and human adult gut bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 464 ~ 475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac015	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 Arzamasov Aleksandr A., Nakajima Aruto, Sakanaka Mikiyasu, Ojima Miriam N., Katayama Takane, Rodionov Dmitry A., Osterman Andrei L.	4. 巻 7
2. 論文標題 Human Milk Oligosaccharide Utilization in Intestinal Bifidobacteria Is Governed by Global Transcriptional Regulator NagR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 e0034322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msystems.00343-22	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 該当する
1. 著者名 Ojima Miriam N., Jiang Lin, Arzamasov Aleksandr A., Yoshida Keisuke, Odamaki Toshitaka, Xiao Jinzhong, Nakajima Aruto, Kitaoka Motomitsu, Hirose Junko, Urashima Tadasu, Katoh Toshihiko, Gotoh Aina, van Sinderen Douwe, Rodionov Dmitry A., Osterman Andrei L., Sakanaka Mikiyasu, Katayama Takane	4. 巻 16
2. 論文標題 Priority effects shape the structure of infant-type Bifidobacterium communities on human milk oligosaccharides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 2265 ~ 2279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41396-022-01270-3	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 Ojima Miriam N, Asao Yuya, Nakajima Aruto, Katoh Toshihiko, Kitaoka Motomitsu, Gotoh Aina, Hirose Junko, Urashima Tadasu, Fukiya Satoru, Yokota Atsushi, Abou Hachem Maher, Sakanaka Mikiyasu, Katayama Takane	4. 巻 88
2. 論文標題 Diversification of a Fucosyllactose Transporter within the Genus Bifidobacterium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e0143721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01437-21	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 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 片山高嶺
2. 発表標題 オリゴ糖が有するプレバイオティクス効果の 分子基盤と応用展開
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片山高嶺
2. 発表標題 酵素のカギ穴から考える ヒトとビフィズス菌の共生
3. 学会等名 第19回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片山高嶺
2. 発表標題 腸内細菌によるムチン型糖鎖の分解は 宿主の健康・疾患に関わる
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takane Katayama
2. 発表標題 Adaptive strategy of bifidobacteria to assimilate human milk oligosaccharides in breastfed infant gut
3. 学会等名 The 11th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takane Katayama
2. 発表標題 Enzymes involved in mucin O-glycan degradation by Bifidobacterium bifidum
3. 学会等名 International Symposium on Microbial Glycoconjugates and the GlySpace Alliance (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学分野 https://www.bunshioutou.lif.kyoto-u.ac.jp/Home.html 京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学 https://www.bunshioutou.lif.kyoto-u.ac.jp/katayama/Home.html</p>

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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	奥田 修二郎 (Okuda Shujiro) (00512310)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	北岡 本光 (Kitaoka Motomitsu) (60353984)	新潟大学・自然科学系・教授 (13101)	
研究分担者	杉山 友太 (Sugiyama Yuta) (80908749)	群馬大学・食健康科学教育研究センター・助教 (12301)	

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