

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：23303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780072

研究課題名（和文） ヒトとの共生を支える腸内細菌のグリコシダーゼ
～生理機能解析とその高度利用～研究課題名（英文） What establishes the symbiotic relationship between human and
bifidobacteria? “A bifidogenic effects of human milk
oligosaccharides “

研究代表者 片山高嶺 (KATAYAMA TAKANE)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：70346104

研究成果の概要（和文）：

母乳栄養児の腸管では、授乳開始後速やかにビフィズス菌優勢な細菌叢（ビフィズスフローラ）が形成されることが知られており、それには母乳中に含まれるオリゴ糖（ヒト母乳オリゴ糖）が関与することが示唆されていたが、その詳細は不明であった。我々は、乳児の糞便から頻りに単離されるビフィズス菌である *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* より、母乳オリゴ糖に作用可能な酵素群を単離同定するとともに、これらの酵素群が実際に母乳オリゴ糖の資化に関わっていることを明らかとした。これらの成果は、母乳栄養児におけるビフィズスフローラ形成の謎を解く極めて重要な発見である。また、ヒトとビフィズス菌の共進化を示唆する興味深い知見も得られた。さらに、人工乳（粉ミルク）をより母乳に近づける目的で母乳オリゴ糖の酵素合成法を確立することを試み、母乳オリゴ糖の最大成分である 2'-fucosyllactose の合成法を開発した。

研究成果の概要（英文）：

The breast-fed infant intestine is often colonized by particular bifidobacteria, and human milk oligosaccharides (HMOs) are considered to be bifidogenic; however, the precise mechanism underlying it remains unresolved. We have isolated and characterized various glycosidases that act on HMOs from *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* and revealed how these enzymes are involved in the degradation of HMOs by these bifidobacteria. These results provide us with essential and basic understanding of physiology of bifidogenic effects of HMOs, and suggested co-evolution of bifidobacteria with humans. We also developed an efficient method of enzymatic synthesis of 2'-fucosyllactose, the most abundant component of HMOs, by introducing a glycosynthase technology into 1,2- α -L-fucosidase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ヒト母乳オリゴ糖・ビフィズス菌・共生・グリコシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

ヒト腸管に生息する細菌にとって、どのようにして栄養を獲得するかは大きな問題である。というのも、資化しやすい単糖や二糖類などはヒト自身によって優先的に利用されてしまい、腸内細菌が生息する小腸下部や大腸には容易に届かないためである。従来、腸内細菌は、食餌成分由来の難消化性オリゴ糖である植物繊維など謂わば“ヒトの消費した残りカス”を利用して生息していると考えられてきた。しかしながら我々は、代表的な腸内細菌であるビフィズス菌が、ヒト母乳オリゴ糖やムチン糖タンパク質などといったヒト自身が分泌する糖質に作用する特異なグリコシダーゼを有していることを見出した。このことは、ヒトと腸内細菌の「共生」を考える上で、新たなパラダイムとなると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①ヒトと腸内細菌の共生(特に乳幼児における)の分子基盤を明らかにすること、および②ヒトの健康に資するオリゴ糖の精密酵素合成法を確立することである。

①ヒトと腸内細菌の共生(特に乳幼児における)の分子基盤を明らかにするために、ヒトの糖質(特にヒト母乳オリゴ糖)に作用する酵素を腸内細菌より単離して構造機能解析を行う。さらに、これらの酵素の発現がヒト由来の糖質によってどのような制御を受けるのかを検討する。②ヒトの健康に資するオリゴ糖の精密酵素合成法を確立するために、取得したグリコシダーゼの立体構造をもとにして改変酵素を作製し、酵素機能の変換を試みる。また、その反応の立体・位置特異性について検討する。

3. 研究の方法

①ヒトと腸内細菌の共生(特に乳幼児における)の分子基盤の解明について

ヒトの糖質に作用する酵素のうち、 β -ガラクトシダーゼ、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ、およびシアリダーゼを、*Bifidobacterium bifidum* および *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* よ

り単離し、その機能解析を行った。また、ビフィズス菌特異的に存在する糖代謝経路上の酵素フルクトース-6-リン酸ホスホクテラーゼを *Bifidobacterium breve* より単離し、X線結晶構造解析を行った。

乳幼児の腸管から単離されるビフィズス菌である *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* をヒト母乳オリゴ糖を含む培地で培養し、そのオリゴ糖分解様式をHPLCで解析するとともに、ビフィズス菌の遺伝子発現様式をqRT-PCRにて解析した。

②ヒトの健康に資するオリゴ糖の精密酵素合成法の確立について

本テーマでは、特にフコシルオリゴ糖に着目した。フコシルオリゴ糖は、カンピロバクター・ジェジュニ(深刻な下痢を引き起こし、発展途上国においては大きな社会問題である)が乳幼児へ感染するのを阻害する機能を有しているため、粉ミルクへの添加が期待されている。1,2- α -L-フコシダーゼのX線結晶構造解析の結果をもとに改変酵素を作製し、フッ化フコースおよびラクトースから2'-フコシルラクトース(母乳オリゴ糖の最大成分)を効率よく合成する手法の開発を行った。

4. 研究成果

①ヒトと腸内細菌の共生(特に乳幼児における)の分子基盤の解明について

Bifidobacterium bifidum より、1種の β -ガラクトシダーゼ(*BbBgIII*)および2種の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ(*BbBhI* および *BbBhII*)を単離した。 β -ガラクトシダーゼ(*BbBgIII*)は、2型糖鎖構造 Gal β 1-4GlcNAc に特異的な酵素であり、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ(*BbBhI*)は、ラクト-*N*-トリオース II (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) に特異的な酵素であった。これらのことから、 β -ガラクトシダーゼ(*BbBgIII*)および β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ(*BbBhI*)は、ラクト-*N*-ネオテトラオース (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) の分解に関与することが

明らかとなった。なお、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (*BbBbhII*) は、 β 1-6 分岐した GlcNAc 残基を遊離した。

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* より、4 種の β -ガラクトシダーゼ (*BiBga2A*, *BiBga42A*, *BiBga 42B*, *BiBga 42C*) を単離、機能解析した。このうち、 β -ガラクトシダーゼ (*BiBga2A*) は、ラクトース (Gal β 1-4Glc) および 2 型糖鎖構造 (Gal β 1-4GlcNAc) に特異的な酵素であったが、 β -ガラクトシダーゼ (*BiBga42A*) は 1 型糖鎖構造 (Gal β 1-3GlcNAc) に特異的であり、しかも、ラクト-*N*-ピオース I (Gal β 1-3GlcNAc) よりもラクト-*N*-テトラオース (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) に対して高い活性を示した。両酵素とも、母乳オリゴ糖を炭素源とした培地で培養した際に、高い発現が見られた。以上のことにより、*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ではヒト母乳オリゴ糖 (1 型および 2 型) の分解に 2 種の β -ガラクトシダーゼを使い分けていることが明らかとなった。

フルクトース-6-リン酸ホスホケトラゼは、ビフィズス菌の同定にも使用される特異的な酵素であり、チアミン-2-リン酸を補酵素として脱水反応を行う。X 線結晶構造解析および変異体解析によりその詳細な反応メカニズムを解明した。

母乳乳幼児の腸管では、授乳開始後速やかにビフィズス菌が増殖する。母乳オリゴ糖を炭素源としてビフィズス菌 (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*) を培養したところ、*Bifidobacterium bifidum* および *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* において良好な増殖が見られた。これらの培養液中のオリゴ糖を蛍光ラベルした後に HPLC 解析に供したところ、*Bifidobacterium bifidum* は細胞外で種々のグリコシダーゼを使用して単糖および 2 糖に分解した後、トランスポーターで取り込んで資化していること、*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* においては、オリゴ糖をそのまま取り込んだ後に細胞内で単糖にまで分解して栄養としていることが明らかとなった。また、*Bifidobacterium breve* および *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* は、ラクト-*N*-テトラオース (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) のみを資化可能であった。ラクト-*N*-テトラオースは、ヒト母乳オリゴ

糖の主要骨格であり、霊長類の中でも、特にヒトの母乳に極めて多量に含まれる構造である。以上の結果により、ビフィズス菌における母乳オリゴ糖資化経路が明らかとなった。また、本研究と通して、ヒトとビフィズス菌の共進化を示唆する重要な知見が得られた。

②ヒトの健康に資するオリゴ糖の精密酵素合成法の確立について

1,2- α -L-フコシダーゼの活性中心に存在する 4 残基を種々のアミノ酸に置換した変異体を作製し、フッ化フコースおよびラクトースからの 2'-フコシルラクトース合成活性を測定した。その結果、フッ化フコースに対して、10%を超える効率で 2'-フコシルラクトースを合成する変異体を取得した。この変異体は、ラクトースのガラクトース残基の 2 位 OH にのみフコシル基を導入可能な極めて立体・位置特異的な反応を触媒した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Yoshida E, Sakurama H, Kiyohara M, Nakajima M, Kitaoka M, Ashida H, Hirose J, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H. (2012). *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* uses two different β -galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. 査読有. **Glycobiology**. 22:361-368. (<http://glycob.oxfordjournals.org/>)
- ② Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, Yoshida E, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H, Ashida H, Hirose J, Kitaoka M. (2011). Physiology of the consumption of human milk oligosaccharides by infant-gut associated bifidobacteria. 査読有. **Journal of Biological Chemistry**. 286:34583-34592. (<http://www.jbc.org/>)
- ③ Kiyohara M, Tanigawa K, Chaiwangsri T, Katayama T, Ashida H, Yamamoto K. (2011). An exo- α -sialidase from bifidobacteria involved in the degradation of sialyloligosaccharides in human milk and intestinal glycoconjugates. 査読有. **Glycobiology**.

21:437-447.

(<http://glycob.oxfordjournals.org/>)

- ④ Suzuki R, Katayama T, Kim BJ, Wakagi T, Shoun H, Ashida H, Yamamoto K, and Fushinobu S. (2010). Crystal structures of phosphoketolase: thiamine diphosphate- dependent dehydration mechanism. 査読有. **Journal of Biological Chemistry**. 285: 34279-34287. (<http://www.jbc.org/>)
- ⑤ Suzuki R, Kim BJ, Shibata T, Iwamoto Y, Katayama T, Ashida H, Wakagi T, Shoun H, Fushinobu S, and Yamamoto K. (2010). Overexpression, crystallization and preliminary X-ray analysis of xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase from *Bifidobacterium breve*. 査読有. **Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallization Communications**. 66:941-943. (<http://journals.iucr.org/f/>)
- ⑥ Miwa M, Horimoto T, Kiyohara M, Katayama T, Kitaoka M, Ashida H, and Yamamoto K. (2010). Cooperation of β -galactosidase and β -*N*-acetyl-hexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. 査読有. **Glycobiology**. 20:1402-1409. (<http://glycob.oxfordjournals.org/>)

[学会発表] (計5件)

- ① 北岡本光, 西本完, 片山高嶺, 清原正志, 和田潤, 芦田久, 山本憲二, 浦島匡. ビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖代謝経路. 63回日本生物工学会大会. 東京農工大学. 平成23年9月26日
- ② 片山高嶺, 朝隈貞樹, 畑山恵美, 浦島匡, 吉田永史奈, 熊谷英彦, 芦田久, 廣瀬潤子, 北岡本光, 山本憲二. ビフィズス菌によるヒトミルクオリゴ糖の分解—培養上清におけるオリゴ糖濃度の経時変化—. 63回日本生物工学会大会. 東京農工大学. 平成23年9月26日
- ③ Takane Katayama, Hisashi Ashida, Motomitsu Kitaoka, Shinya Fushinobu, Hidehiko Kumagai, and Kenji Yamamoto. A UNIQUE PATHWAY OF BIFIDOBACTERIA FOR THE DEGRADATION OF HUMAN MILK OLIGOSACCHARIDES. International Union of Microbiological Societies 2011

Congress, Sapporo, September 9th, 2011

- ④ 吉田永史奈, 中島将博, 北岡本光, 廣瀬潤子, 清原正志, 片山高嶺, 山本憲二, 熊谷英彦. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC15697 株のヒトミルクオリゴ糖分解酵素. 日本農芸化学会 2011 年度大会. 京都女子大学. 平成 23 年 3 月 27 日
- ⑤ 片山高嶺, 本多裕司, 熊谷英彦, 山本憲二. ビフィズス菌ヒトミルクオリゴ糖分解酵素を利用したフコシルオリゴ糖の調製. 日本農芸化学会 2011 年度大会 シンポジウム. 京都女子大学. 2011 年 3 月 28 日
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
片山高嶺 (KATAYAMA TAKANE)
石川県立大学・生物資源環境学部・
准教授
研究者番号 : 70346104