

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580119

研究課題名(和文) 母乳オリゴ糖を介したビフィズス菌とヒトの共生・共進化—分子基盤の解明と応用展開—

研究課題名(英文) Milk oligosaccharides-mediated symbiosis and co-evolution between bifidobacteria and humans

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・寄附講座教授

研究者番号：70346104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

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が形成されることが100年近く前から知られていたが、そのメカニズムは不明であった。最近、研究代表者らは、乳児糞便から単離されるビフィズス菌が母乳に含まれる重合度3以上のオリゴ糖(母乳オリゴ糖)を特異的に資化する経路を有していることを見出し、その経路上の酵素について研究を行っている。本申請課題はビフィズス菌が有する母乳オリゴ糖資化経路の全容を明らかとする目的で行った。その結果、母乳オリゴ糖資化に関わる新規な酵素2種を単離することに成功し、それらについて詳細な機能解析を行った。また、それ以外の2種の酵素のX線結晶構造解析も行った。

研究成果の概要(英文)：Breast-fed infant intestines generally have microbiota rich in bifidobacteria, and the population of the bacteria in the ecosystem drastically decreases after weaning. This suggests that human milk has a bifidogenic compound; however, the mechanism underlying it remains elusive. We have recently found that infant gut-associated bifidobacteria are equipped with genetic and enzymatic sets dedicated to the utilization of oligosaccharides contained in human milk (human milk oligosaccharides, HMOs). In this study, we aimed to obtain a comprehensive understanding of the HMOs assimilation pathway of bifidobacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌 母乳オリゴ糖 共生 共進化 糖質分解酵素

### 1. 研究開始当初の背景

母乳栄養児腸管では、授乳開始後速やかにビフィズス菌優勢な腸内菌叢が形成されることが知られている。これには母乳に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が示唆されていたが、そのメカニズムは全く分かっていなかった。

申請者らは、ビフィズス菌が母乳オリゴ糖を特異的に資化する酵素を有していることを見出し、この経路上の酵素の構造機能解析を行ってきた。

### 2. 研究の目的

本研究は、ビフィズス菌が発見されて以来100年間にわたって未解明であった課題「母乳栄養児の腸管では、何故、ビフィズスフローラが形成されるのか」(ビフィズス菌とヒトの共生)を、ビフィズス菌による母乳オリゴ糖代謝の視点から解明するとともに、ビフィズス菌とヒトの共進化の分子基盤を探ることを目的とした。また、母乳オリゴ糖を人工乳へ添加することを目標に、母乳オリゴ糖の精密酵素合成法を開発することを目標とした。

### 3. 研究の方法

母乳オリゴ糖の主要コア構造であるラクト-N-テトラオースに作用する酵素を中心に解析した。ラクト-N-ピオシダーゼ(LnbX)は *Bifidobacterium longum* ゲノムより大腸菌を用いた発現クローニングによって単離した。ラクト-N-テトラオース-β1,3-ガラクトシダーゼ(Bga42A)は、ゲノムマイニングによって *Bifidobacterium infantis* より単離した。*Bifidobacterium bifidum* 由来のラクト-N-ピオシダーゼ(LnbB)の構造解析は、活性ドメインのみ結晶化して行った。

フコシターゼ化は、求核残基に変異を導入することでを行い、種々のアクセプターを用いてその特異性を調べた。

### 4. 研究成果

*Bifidobacterium longum* より新規なアミノ酸配列を有するラクト-N-ピオシダーゼ(LnbX)を単離した。本酵素遺伝子の下流に存在する *lnbY* 遺伝子は、LnbXの専用シャペロンであることを見出した。すなわち、LnbXのみでは凝集して不活性型となるものの、LnbYの存在下では活性化型となることをリフォールディング実験により確認した。グリコシダーゼにおいて専用のシャペロンを必要とする例は、これまで知られておらず本報告が最初である。LnbXYのホモログは、5種の腸内細菌ゲノム上のみ存在しており、その進化に興味を持たれる。なお、本酵素はユニークな基質特異性を有しており、母乳オリゴ糖のみならずグロボシド糖鎖構造にも作用した。

ラクト-N-テトラオースは、その非還元末端にGalβ1-3GlcNAcという1型構造を有している。殆どの生物はβ-ガラクトシダーゼを有しているが、それらはラクトースや2型糖鎖Galβ1-4GlcNAc構造には作用するものの1型構造には作用しないことが知られている。

*Bifidobacterium infantis* の無細胞抽出液をよりラクト-N-テトラオースに作用させたところGalの遊離が観察されたため、Galβ1-3GlcNAcに作用するβ-ガラクトシダーゼを単離することを試みた。詳細は省くが、ゲノムマイニングにより6種の候補遺伝子を単離し、それらの性質を調べたところGalβ1-3GlcNAcに作用する酵素を見出した。興味深いことに、本酵素(Bga42A)は、Galβ1-3GlcNAcよりも、その還元末端にラクトースがふかしたラクト-N-テトラオース(Galβ1-3GlcNAcβ1-3Lac)に高い活性を示したため、本酵素をラクト-N-テトラオース-β1,3-ガラクトシダーゼと命名した。

*Bifidobacterium bifidum* 由来のラクト-N-ピオシダーゼ(LnbB)については欠失解析により活性ドメイン(アミノ酸残基37-663)を単離し、結晶化に用いた。その結果、反応産物であるラクト-N-ピオースとの共結晶が得られた。X線構造解析を行い、1.8 Åで構造を決定した。本酵素は、β-N-アセチルヘキソサミニダーゼと非常に似た構造であったが、Galβ1-3GlcNAcの2糖構造のうちGalを認識するポケットを余分に有しており、この領域をモチーフとすることで両酵素をアミノ酸配列レベルで明確に区別することが可能となった。

1,3-1,4-α-L-フコシダーゼが、ルイス a/x 構造[Galβ1,3/4(Fuca1,4/3)GlcNAc]には作用するものの、そこからGalのとれたFuca1,4/3GlcNAcには作用しないことを見出した。X線結晶構造解析を行ったところ、Galを認識するサイトが存在することが明らかとなり、そこにGalが結合することによりinduced-fitが起こること(Galを持たない基質には作用できない理由)が明らかとなった。フッ化フコースを用いてアクセプター特異性を調べたところ、ルイス構造を特異的に合成可能であることが明らかとなった。

以上の研究により、ビフィズス菌が有する母乳オリゴ糖資化経路上のすべての酵素を構造・機能的に理解することが可能となった。

### 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10件)

Gotoh A, Katoh A, Sugiyama Y, Kurihara S, Honda Y, Sakurama H, Kambe T, Ashida H, Kitaoka M, Yamamoto K, and Katayama T. (2015). Novel substrate specificities of two lacto-N-biosidases towards β-linked galacto-N-biose-containing oligosaccharides of globo H, Gb5, and GA1. **Carbohydrate Research**. 408:18-26. doi: 10.1016/j.carres.2015.03.005. Peer reviewed. Shimada Y, Watanabe Y, Wakinaka T,

Funeno Y, Kubota M, Chaiwangsri T, Kurihara S, Yamamoto K, Katayama T, and Ashida H. (2015).  $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* specifically hydrolyzes  $\alpha$ -linked N-acetyl-glucosamine at nonreducing terminus of O-glycan on gastric mucin. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 99:3941-3948. doi: 10.1007/s00253-014-6201-x. Peer reviewed.

Viborg AH, Fredslund F, Katayama T, Nielsen SK, Svensson B, Kitaoka M, Lo Leggio L, and Abou Hachem M. (2014). A  $\beta$ 1-6/  $\beta$ 1-3 galactosidase from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 gives insight into subspecificities of  $\beta$ -galactoside catabolism within *Bifidobacterium*. **Molecular Microbiology**. 94:1024-1040. doi: 10.1111/mmi.12815. Peer reviewed.

Viborg AH, Katayama T, Abou Hachem M, Andersen MC, Nishimoto M, Clausen MH, Urashima T, Svensson B, Kitaoka M. (2014). Distinct substrate specificities of three glycoside hydrolase family 42  $\beta$ -galactosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. **Glycobiology** 24(2):208-216. doi: 10.1093/glycob/cwt104. Peer reviewed.

Honda Y, Nishimoto M, Katayama T, and Kitaoka M. (2013). Characterization of the cytosolic  $\beta$ -N-acetyl-glucosaminidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. **Journal of Applied Glycoscience**. 60:141-146. Peer reviewed.

Sakurama H, Kiyohara M, Wada J, Honda Y, Yamaguchi M, Fukiya S, Yokota A, Ashida H, Kumagai H, Kitaoka M, Yamamoto K, Katayama T. (2013). Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of *Bifidobacterium longum* subspecies *longum* shows unique substrate specificity and requires a designated chaperone for its active expression. **Journal of Biological Chemistry**. 288(35):25194-25206. doi: 10.1074/jbc.M113.484733. Peer reviewed.

Ito T, Katayama T, Hattie M, Sakurama H, Wada J, Suzuki R, Ashida H, Wakagi T, Yamamoto K, Stubbs KA, and Fushinobu S. (2013). Crystal structures of a glycoside hydrolase family 20 lacto-N-biosidase from *Bifidobacterium bifidum*. **Journal of Biological Chemistry**. 288(17):11795-11806. doi: 10.1074/jbc.M112.420109. Peer

reviewed.  
Wakinaka T, Kiyohara M, Kurihara S, Hirata A, Chaiwangsri T, Ohnuma T, Fukamizo T, Katayama T, Ashida H, and Yamamoto K. (2013). Bifidobacterial  $\alpha$ -galactosidase with unique carbohydrate-binding module specifically acts on blood group B antigen. **Glycobiology**. 23(2):232-240. doi: 10.1093/glycob/cws142. Peer reviewed.

Sakurama H, Tsutsumi E, Ashida H, Katayama T, Yamamoto K, and Kumagai H. (2012). Difference in the substrate specificities and active-site structures of two  $\alpha$ -L-fucosidases (glycoside hydrolase family 29) from *Bacteroides thetaiotaomicron*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 76:1022-1024. Peer reviewed.

Sakurama H, Fushinobu S, Hidaka M, Yoshida E, Honda Y, Ashida H, Kitaoka M, Kumagai H, Yamamoto K, and Katayama T. (2012). 1,3-1,4- $\alpha$ -L-Fucosynthase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. **Journal of Biological Chemistry**. 287(20):16709-19. doi: 10.1074/jbc.M111.333781. Peer reviewed.

〔学会発表〕(計2件)

杉山友太、後藤愛那、本多裕司、吉田永史奈、栗原新、北岡本光、山本憲二、片山高嶺・ヒトミルクオリゴ糖の酵素合成に向けた高効率 1,2- $\alpha$ -L-フコシターゼの作出・日本農芸化学会 2015 年度大会・岡山・3月28日  
片山高嶺・ヒトミルクオリゴ糖に作用するピフィズス菌の酵素～機能解析と応用～・2014年度日本農芸化学会大会・東京・3月29日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://host-microbe.ishikawa-pu.ac.jp>

石川県立大学腸内細菌共生機構学講座

## 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・教授

研究者番号：70346104

### (2)研究分担者

日高 将文 (HIDAKA Masafumi)

東北大学・(連合)農学研究科・助教

研究者番号：00584848

### (3)連携研究者

廣瀬 潤子 (HIROSE Junko)

滋賀県立大学・人間環境学部・准教授

研究者番号：40381917