

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19231

研究課題名(和文) シンビオジェニック因子から理解する腸内細菌とヒトの共生およびその応用展開

研究課題名(英文) Host-microbe symbiosis mediated through symbiogenic factors

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：乳児期に形成される腸内細菌叢は宿主の成長後の健康にも大きな影響を与えるため、その形成機構を解明することは重要である。母乳栄養児では授乳開始直後にビフィズスフローラが形成されるが、申請者はこれには母乳に含まれるオリゴ糖成分が関わっていることを明らかとしてきた。本研究では、このような宿主-腸内細菌間で授受される化合物を「シンビオジェニック因子」として捉え、そのような因子を同定して分子メカニズムを解明すること、またそのような因子を酵素合成することを試みた。その結果、ビフィズスフローラ形成にかかわるビフィズス菌遺伝子を同定すると共に、母乳オリゴ糖の主成分ラクト-N-テトラオースの酵素合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者はこれまで、乳児腸管におけるビフィズスフローラ形成には母乳オリゴ糖が関与していることを世界に先駆けて明らかとしてきた。本研究では、実際のビフィズスフローラ形成にかかわるビフィズス菌遺伝子を同定すると共に、これまでに単離されたすべてのビフィズス菌が資化可能な母乳オリゴ糖ラクト-N-テトラオースの酵素合成法を開発した。これらの成果は、より人乳に近い調整乳を開発する上で重要な科学的基盤となると考えられる。また、人乳成分を介したビフィズス菌とヒトの共生・共進化を考える上で新しいパラダイムを提供した。

研究成果の概要(英文)：Gut microbiota formed during infancy has life-long effects on host health. Breast-fed infant intestines are generally dominated by bifidobacteria, for which oligosaccharides contained in milk play a important role. We have revealed that bifidobacteria possess species/strain-specific pathways for assimilating human milk oligosaccharides among gut microbes, thereby selectively proliferating in the gut ecosystem. In this project, we tried to understand the symbiosis between gut microbes and humans by "symbiogenic factor(s)", chemical compound(s) that supports interplay between the two organisms. As a result, we have identified key genetic factors that contribute to the bifidus flora formation in infant guts. Also, we have developed an efficient enzymatic method to synthesize lacto-N-tetraose, a major core structure of human milk oligosaccharides. These results could serve as scientific basis to improve formula milk.

研究分野：応用微生物学

キーワード：母乳オリゴ糖 ビフィズス菌 ラクト-N-テトラオース

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌と宿主の共生が注目を集めているが、殆どの研究は両者の「相関」を調べたものであり、相関を担う「物質」を同定した例は多くない。また、疾患への関与が疑われる菌種なども報告されており、これらの成果は早期診断や予防に重要な発見であるが、何が腸内細菌とヒトの共生を成立させているのか、については不明な点が多い。

申請者は、2004年よりヒト自身が産生する糖質、すなわち母乳オリゴ糖やムチン型糖鎖に着目し、一部の腸内細菌がこれらの糖質を資化する特異な経路を有していることを明らかとてきた。特に、母乳栄養児の糞便から単離されるビフィズス菌（乳児型ビフィズス菌）におけるヒト母乳オリゴ糖資化経路に着目し、その経路上の遺伝子・酵素群の構造機能解析を行うと共に、乳児糞便 DNA や糞便中の母乳オリゴ糖の消長を解析することで、これらビフィズス菌由来の遺伝子・酵素群が腸管内で機能し、ビフィズス菌優勢な細菌叢（ビフィズスフローラ）形成に重要な役割を果たしていることを明らかとてきた。これらの結果は、ヒトが積極的に物質を介して腸内細菌叢を制御しようとしていることを意味しており、申請者はそのような化合物を「シンビオジェニック因子*」として捉え、ヒトとの腸内細菌の共生を物質から理解したいと考えた。

*シンビオジェニック因子：宿主もしくは腸内細菌が産生する低分子化合物で、ドメインを超えて相手側の生理機能に影響を及ぼし、共生を成立させる物質。Symbiosis と genesis から作出した造語。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと「シンビオジェニック因子」をキーワードとして、ヒトと腸内細菌の共生の分子基盤を解明すると共に、良い共生を生み出す方法論を確立することを目的とした。特に近年の研究により、乳児期に形成される腸内細菌叢が、一生に渡ってヒトの健康にかかわることが明らかとされてきたため、乳児期におけるビフィズスフローラ形成の基盤解明や、ビフィズスフローラ形成の生理的意義の解明、またビフィズスフローラ形成を促す物質の合成法開発に焦点を絞って研究に取り組んだ。その具体的な内容は、以下のとおりである。

- 1) ヒト母乳オリゴ糖を介したヒトとビフィズス菌の共生・共進化
- 2) ヒト母乳オリゴ糖の主成分ラクト-N-テトラオースの酵素合成法開発
- 3) コレステロールトランスポーター活性を制御するビフィズス菌代謝物の探索

3. 研究の方法

1) ヒト母乳オリゴ糖を介したヒトとビフィズス菌の共生・共進化

助産院の協力を得て母乳を回収すると共に、母乳栄養児と混合乳（母乳+人工乳）栄養児の糞便も回収した。母乳は一部を残して合一し、ヒト母乳オリゴ糖精製に使用した。精製は、クロロホルム・メタノール抽出後に、凍結乾燥、ゲルろ過、脱塩により行った。糞便は凍結乾燥後にビーズ破砕機を用いて粉末化し、その後、定法によって DNA を抽出した。抽出した DNA は、菌叢解析および定量 PCR 解析に用い、ビフィズスフローラ形成やその形成に果たすビフィズス菌遺伝子の役割を調べた。

また、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 由来のラクト-N-ビオシダーゼの構造機能相関を調べるために X 線結晶構造解析を行った。大腸菌 T7 システムを用い、His タグ付加組換え酵素として発現させ、アフィニティーカラムおよびイオン交換クロマトグラフィーで精製した。結晶化はシッティングドロップ法にて行った。またラクト-N-ビオースとの共結晶化にも取り組んだ。得られた結晶は、高エネルギー加速器研究機構もしくは Spring-8 のビームラインでのデータ取得に用いた。またこれとは別に、*Bifidobacterium bifidum* によるヒトミルクオリゴ糖分解物のクロスフィーディングがビフィズスフローラ形成に果たす役割について検討を加えた。その際に使用した糞便は、幼児から成人のボランティアより提供いただいた。さらに、*B. bifidum* JCM 7004 株の完全ゲノム配列を決定し、母乳オリゴ糖資化経路上の酵素情報について詳細に解析した。

2) ヒト母乳オリゴ糖の主成分ラクト-N-テトラオースの酵素合成法開発

母乳オリゴ糖は 100 種類以上の混合物からなるが、そのうちの主成分であり、これまでに単離された乳児型ビフィズス菌の全ての株が資化可能であるラクト-N-テトラオースの酵素合成に取り組んだ。酵素への変異導入は定法に従ってインバース PCR 法もしくは QuikChange 法を使用した。変異酵素は T7 システムを用いて大腸菌で His タグ付加組換え酵素として発現させて、上記と同様に精製した。工業化を考えて、変異型酵素以外の酵素や基質は安価に入手できる市販品を利用した。基質であるガラクトース-1-リン酸およびラクト-N-トリオース II は市

販品を使用した。

変異酵素の速度論的解析は、加リン酸分解反応においては生じるガラクトース-1-リン酸を定量することで、また、合成反応においては遊離するリン酸を定量することで行った。

3) コレステロールトランスポーター活性を制御するビフィズス菌代謝物の探索

末梢細胞からのコレステロール排出に関わるトランスポーターの活性を制御するビフィズス菌代謝物の単離を試みた。スクリーニングには、ABCA1 や ABCG1 を異種発現する培養細胞株および THP-1 細胞を使用した。ビフィズス菌は *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *B. bifidum*, および *B. longum* を使用した。これらの菌を通常の培地やヒト由来の糖質を含む培地で培養し、その培養上清および菌体画分を回収後、定法に従って抽出し、エバポレーターや凍結環礁で濃縮したものをサンプルとして使用した。上記細胞にサンプルを添加した後、経時的に上清を取り出してコレステロールを定量した。定量は酵素法によって行った。

4. 研究成果

1) ヒト母乳オリゴ糖を介したヒトとビフィズス菌の共生・共進化

糞便 DNA の菌叢解析および定量 PCR 解析の結果、母乳栄養児の糞便では、混合乳栄養児のそれに比べて有意にビフィズスフローラ形成率が高いこと、特に *B. longum* の占有率が高いことが明らかとなった。*B. longum* の一部の株はラクト-*N*-ビオシダーゼという母乳オリゴ糖分解酵素を有しているが、この遺伝子の定量 PCR 解析を行ったところ、母乳栄養児の糞便中では混合乳栄養児のそれ比べて有意にラクト-*N*-ビオシダーゼ遺伝子が濃縮されていることが明らかとなった。さらに、母乳栄養児の糞便中ではラクト-*N*-ビオシダーゼ遺伝子の検出率が 50% であったのに対し、混合乳栄養児の糞便中では 17% しかないことが明らかとなった。また、母乳栄養児の糞便 DNA 中のラクト-*N*-ビオシダーゼ遺伝子量と *B. longum* 量の間には、有意ではないものの正の相関が見られたが、混合乳栄養児の糞便においてはこのような相関は全く見られなかった。これらの結果を受けて、登録されているメタゲノムデータベースを使ってデータマイニングを行ったところ、やはり、母乳栄養児の糞便中でラクト-*N*-ビオシダーゼ遺伝子が濃縮されていることが明らかとなった（なお、この場合は、完全母乳栄養児と完全人工乳栄養児を比較したデータベースを使用した）。これらの結果は、母乳オリゴ糖が乳児腸管の中で強い選択圧となっていること、また、ラクト-*N*-ビオシダーゼが *B. longum* の腸管内における増殖に重要な役割を果たしていることを強く示唆していた。

次に、*B. longum* 由来のラクト-*N*-ビオシダーゼの様々な欠失変異体を作製することで、その活性発現に必要な最小領域（活性ドメイン）を同定した。その活性ドメイン領域を His タグ付加組換え酵素として発現させ、結晶化を行った。その結果、アポ構造および反応産物であるラクト-*N*-ビオースとの複合体構造を 2.5 オングストロームの分解能で決定することに成功した。*B. longum* 由来のラクト-*N*-ビオシダーゼは β -ヘリックス構造を取っており、それまでに知られていた *B. bifidum* 由来のラクト-*N*-ビオシダーゼ（TIM バレル構造）とは全く異なる構造を有していた。これらの 2 種のビフィズス菌は、乳児腸管内という同じ環境に生育し、同じ母乳オリゴ糖（ラクト-*N*-テトラオース）を炭素源としながらも、それぞれ独立してラクト-*N*-ビオシダーゼを進化させてきたことが推察され、ビフィズス菌の進化を考える上で非常に興味深い。なお、これら酵素は同じ基質（ラクト-*N*-テトラオース）を同程度の速度パラメーターで分解することが可能である。活性中心は、*B. longum* 由来のラクト-*N*-ビオシダーゼでは浅いくぼみに形成されていたが、*B. bifidum* 由来のラクト-*N*-ビオシダーゼは 2 糖を包み込むように形成されていた。*B. longum* 由来のラクト-*N*-ビオシダーゼはフコースによる修飾を受けた基質にも弱い活性で作用可能であるが、*B. bifidum* 由来のラクト-*N*-ビオシダーゼは全く作用しない。この基質特異性の違いは、上記の活性中心の構造的差異から生じていることが明らかとなった。このような結果を受けて、*B. longum* 由来のラクト-*N*-ビオシダーゼは、新しい糖質分解酵素ファミリー 136（GH136）として登録されることとなった。

B. bifidum は乳児型ビフィズス菌の中では少数派として知られているが、本菌種を糞便中にある程度保有する乳児においてはビフィズスフローラ形成率が高いことが知られている。*B. bifidum* を、ラクト-*N*-テトラオースしか利用できない *B. longum* と共培養すると、*B. longum* の生育が著しく上昇することが明らかとなった。そこで、幼児および成人の糞便を回収し、その糞便懸濁液をヒト母乳オリゴ糖存在下で *B. bifidum* 添加もしくは非添加で培養し、ビフィズスフローラ形成率を定量 PCR で調べた。その結果、*B. bifidum* を添加することで、*B. bifidum* 以外の乳児型ビフィズス菌が大幅に増殖し、結果として、ビフィズスフローラ形成率も大幅に上昇することが明らかとなった。興味深いことに、この促進効果は、元々の糞便中に *B. bifidum* がわずかにでも含まれていた検体では弱く、*B. bifidum* 検出限界以下であった検体では強く観察された。このような現象はヒト母乳オリゴ糖を炭素源として添加したときのみ観察され、グルコースを炭素源として添加した際には全く見られなかった。また、母乳オリゴ糖分解酵素として重要な機能を有するフコシダーゼ（*B. bifidum* が有している）のインヒビター（デオキシフコノジリマイシン）を添加した場合には、*B. bifidum* による他ビフィズス菌の増殖促進効

果は消失した。*B. bifidum* は細胞外に母乳オリゴ糖分解酵素を多数発現しており、これらの酵素遺伝子はこれまでにゲノム配列が決定された株の全てにおいて保存されており、本研究で決定した JCM 7004 株のゲノム上にも完全に保存されていた。*B. bifidum* はこれらの菌体外酵素でヒト母乳オリゴ糖を分解し、他のビフィズス菌にクロスフィードすることでビフィズスフローラ形成を促していることが強く示唆された。これらの結果は、*B. bifidum* を用いた臨床介入を行う際の基盤となると考えられる。また、minority species が菌叢形成全体に関わるということを示唆する結果でもあり、今後は major species のみならず minority species にも着目すべきであるという提言を行うきっかけともなった。

2) ヒト母乳オリゴ糖の主成分ラクト-*N*-テトラオースの酵素合成法開発

ラクト-*N*-ピオース/ガラクト-*N*-ピオースホスホリラーゼは、ビフィズス菌が特異的に有する酵素である。本酵素はラクト-*N*-ピオースおよびガラクト-*N*-ピオースの 2 糖構造にのみ作用し、ガラクトース-1-リン酸および *N*-アセチルグルコサミンもしくは *N*-アセチルガラクトサミンを生じる。その生理的反応は加リン酸分解反応であるが、本反応は可逆的であるためにオリゴ糖の合成にも利用可能である。他のホスホリラーゼにおいて既に実用化例などもあることから、本研究ではホスホリラーゼ工学を用いたラクト-*N*-テトラオース合成法を開発することとした。

まず、ラクト-*N*-ピオース/ガラクト-*N*-ピオースホスホリラーゼの結晶構造が既に決定されていたので、その活性中心にラクト-*N*-テトラオースを組込んだモデル構造を作製した(構造中の GlcNAc を重ね合わせに使用した)ところ、還元末端側のラクトース、特にグルコースが酵素側に衝突する可能性が示唆された。本酵素は上述の通り 2 糖に厳密に特異性を示すが、この衝突が 2 糖以上のオリゴ糖の作用を妨げていると考え、該当する部位を様々に欠失・置換した変異体を作製し、ラクト-*N*-テトラオースに対する作用を調べた。その結果、ある部位の 7 アミノ酸残基を、ある特定の 3 アミノ酸残基に変換した変異体 2 種がラクト-*N*-テトラオースに対して高い加リン酸分解活性を示すことが明らかとなった。そこで本変異体 2 種を精製して、酵素学的パラメーターを決定して性状解析を行うと共に、逆反応を用いたラクト-*N*-テトラオース合成に取り組んだ。その結果、これら 2 種の変異体はほぼ同程度の特異性や活性を有していた。ガラクトース-1-リン酸に対する K_m は野生型と同程度であったが、*N*-アセチルグルコサミンに対する K_m は非常に上昇していた、一方、ラクト-*N*-トリオース II に対する K_m も高濃度過ぎて決定することが出来なかった。ただし、この結果は、モノづくりという観点からは否定的にとらえる必要はなく、基質を高濃度で添加しても反応速度が頭打ちにならないということを意味している。

次に、変異体酵素を用いてラクト-*N*-テトラオース合成に取り組んだ。なお、逆反応においてはリン酸が遊離するが、この遊離リン酸を除去する反応系(スクロースとスクロースホスホリラーゼを添加し、遊離リン酸を消費させる)を組込んだ。その結果、ガラクトース-1-リン酸およびラクト-*N*-トリオース II からラクト-*N*-テトラオースを効率的に合成可能であり、反応液中に添加したラクト-*N*-トリオース II の 100% がラクト-*N*-テトラオースへと変換されることが明らかとなった。また、反応液中には、添加した基質から予想される生産物以外の糖は全く生じていなかった。反応生成物を精製し、NMR や MS 分析を行って結果、ラクト-*N*-テトラオースであることが確認できた。以上のことから、ラクト-*N*-テトラオースの効率的な合成法を開発したと言える。現在までに 100 mg 程度のラクト-*N*-テトラオースを理論収率の 60% 程度で精製しており、さらなるスケールアップに取り組んでいる。

3) コレステロールトランスポーター活性を制御するビフィズス菌代謝物の探索

ビフィズス菌には血中コレステロールの改善効果があることが知られている。そこで、末梢血における HDL 形成に重要な役割を果たすコレステロールトランスポーターの活性に与えるビフィズス菌代謝物の探索を試みた。スクリーニングには、ABCA1 や ABCG1 を異種発現する培養細胞および THP-1 細胞から分化させたマクロファージ様細胞を使用した。その結果、ヒト由来の成分を含有する培地でビフィズス菌を培養した後のクロロホルム抽出画分にコレステロール排出活性を上昇させる活性があることが明らかとなった。現在、本画分の精製を試みている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Gotoh A, Ojima MN, and Katayama T. Minority species influences microbiota formation: The role of *Bifidobacterium* with extracellular glycosidases in bifidus flora formation in breast-fed infant guts. *Microbial Biotechnology*. 12:259-264 (2019). doi:10.1111/1751-7915.13366

Ashida H, Tanigawa K, Kiyohara M, Katoh T, Katayama T, and Yamamoto K. Bifunctional properties and characterization of a novel sialidase with esterase activity from *Bifidobacterium bifidum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 82:2030-2039 (2018). doi: 10.1080/09168451.2018.1497944.

Gotoh A, Katoh T, Sakanaka M, Ling Y, Yamada C, Asakuma S, Urashima T, Tomabechi Y, Katayama-Ikegami A, Kurihara S, Yamamoto K, Harata G, He F, Hirose J, Kitaoka M, Okuda S. and Katayama T. Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. *Scientific Reports*. 8:13958 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-32080-3

Viborg AH, Katayama T, Arakawa T, Abou Hachem M, Lo Leggio L, Kitaoka M, Svensson B, and Fushinobu S. Discovery of α -L-arabinopyranosidases from human gut microbiome expands the diversity within glycoside hydrolase family 42. *Journal of Biological Chemistry*. 292:21092-21101 (2017). doi: 10.1074/jbc.M117.792598.

Katoh T, Maeshibu T, Kikkawa K, Gotoh A, Tomabechi Y, Nakamura M, Liao WH, Yamaguchi M, Ashida H, Yamamoto K, and Katayama T. Identification and characterization of a sulfoglycosidase from *Bifidobacterium bifidum* implicated in mucin glycan utilization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 81:2018-2027 (2017). doi: 10.1080/09168451.2017.1361810.

Yamada C, Gotoh A, Sakanaka M, Hattie M, Stubbs KA, Katayama-Ikegami A, Hirose J, Kurihara S, Arakawa T, Kitaoka M, Okuda S, Katayama T, and Fushinobu S. Molecular insight into evolution of symbiosis between breast-fed infants and a member of the human gut microbiome *Bifidobacterium longum*. *Cell Chemical Biology*. 24:515-524 (2017). doi: 10.1016/j.chembiol.2017.03.012.

〔学会発表〕(計7件)

片山 高嶺、乳児腸管におけるビフィズスフローラ形成機構とその意義、ビジョナリー農芸化学 100、2018年11月18日、東京

加藤 紀彦、丹沢 充裕、桑葉 潮音、片山 高嶺、*Bifidobacterium bifidum*はAfcA N末端ドメインを介してムチン糖鎖と相互作用する、第37回日本糖質学会年会、2018年8月28日、宮城

阪中 幹祥、前田 信悟、後藤 愛那、村上 隆太、加藤 紀彦、杉山 友太、谷内 寛之、栗原 新、玉置 尚徳、吹谷 智、横田 篤、片山 高嶺、ABCトランスポーターを介したビフィズス菌の糖質取込みを包括的に制御するATP加水分解酵素、2018年日本乳酸菌学会、2018年7月13日、東京

片山 高嶺、母乳成分を介したビフィズス菌とヒトの共生・共進化、日本農芸化学会 2018年度大会、2018年3月18日、愛知

片山 高嶺、乳児のビフィズス菌とヒトミルクオリゴ糖利用、森永乳業創業100周年記念国際シンポジウム、2018年1月28日、東京

後藤 愛那、岸野 重信、廣瀬 潤子、栗原 新、加藤 紀彦、奥田 修二郎、片山 高嶺、小川 順、ヒト母乳オリゴ糖とヒト乳脂肪から考えるビフィズス菌とヒトの共進化、2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6日、兵庫

諏訪 英理子、池本 柚花子、後藤 愛那、加藤 紀彦、片山 高嶺、松尾 道憲、ABCタンパク質によるコレステロール排出を活性化する腸内細菌由来成分の探索、2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6日、兵庫

〔図書〕(計1件)

後藤 愛那、加藤 紀彦、阪中 幹祥、片山 高嶺、医薬出版、ヒト母乳オリゴ糖を介した乳児腸管におけるビフィズスフローラ形成機構、pp 31-38 *in* 腸内フローラの形成と疾患 (神谷 茂 編)、2018

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称：改変ホスホリラーゼを利用したラクト - N - ビオース I またはガラクト - N - ビオースの グリコシドの酵素合成法

発明者：片山 高嶺、加藤 紀彦、北岡 本光

権利者：国立大学法人京都大学、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

種類：特許願

番号：2018-157840

出願年：2018年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bunshioutou.lif.kyoto-u.ac.jp/katayama/Home.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松尾 道憲

ローマ字氏名：MATSUO, Michinori

所属研究機関名：京都女子大学

部局名：家政学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00335308

研究分担者氏名：加藤 紀彦

ローマ字氏名：KATOH, Toshihiko

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院生命科学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：40724612

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。