

平成 30 年 9 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04481

研究課題名(和文) ビフィズス因子としての母乳オリゴ糖～ビフィズスフローラ形成の謎の解明と応用展開～

研究課題名(英文) Human milk oligosaccharides as the bifidus factor: the mechanism underlying how bifidus flora is established 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) 8,300,000円

研究成果の概要(和文)：母乳栄養児の腸管ではビフィズスフローラが形成されることが知られていたが、その分子機構は解明されていなかった。我々は、ビフィズス菌が母乳中で3番目に多く含まれる成分であるオリゴ糖(母乳オリゴ糖)を資化する特異的な酵素群を有していることを見出し、それら酵素について解析を行った。その結果、母乳オリゴ糖の主要成分であるラクト-N-テトラオースを分解する酵素ラクト-N-ピオシダーゼがビフィズスフローラ形成に重要であることを明らかとした。また、酵素を改変することでラクト-N-テトラオース合成法を開発した。ビフィズス因子として人工乳への添加が期待される。

研究成果の概要(英文)：It has long been known that bifidobacteria-rich microbiota (bifidus flora) is formed in breast-fed infant intestines; however the underlying mechanism has not been elucidated. We have found that infant gut-associated bifidobacteria have an ability to assimilate human milk oligosaccharides (HMOs) that comprises the third most abundant solid component. In this study, we focused on lacto-N-biosidase, which hydrolyzes lacto-N-tetraose (the most abundant core HMO structure), and revealed that the enzyme plays an important role in bifidus flora formation in infants. In addition, we succeeded in developing an efficient method to synthesize lacto-N-tetraose by mutating a relevant enzyme. The compound can be used for formula milk fortification.

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 共生 共進化

1. 研究開始当初の背景

乳児期における腸内細菌叢の形成は、成長後の健康(肥満やアレルギー発症)に大きな影響を及ぼすことが明らかとなってきた。そのため、乳児期における腸内細菌叢の形成機構を知ることは極めて重要な課題である。

ヒト乳児の腸管においては授乳開始と同時にビフィズス菌が速やかに増殖してビフィズスフローラが形成される。このフローラは離乳と同時に消滅し、成人型のフローラへと移行することが知られている。このことは、人乳中にはビフィズス菌を選択的に増殖させる因子(ビフィズス因子)が含まれていることを示唆しており、多くの研究者がその実体を解明しようと努力してきたが、ビフィズス菌が発見されて100年以上たっても解明されていなかった。

人乳には、乳糖・脂質に次ぐ成分としてオリゴ糖(母乳オリゴ糖)が含まれている(10~20 g/L)。これほど多く含まれる成分でありながら、ヒトの消化酵素には耐性であるために乳児の栄養源とはならない。それにもかかわらず、母親は乳腺においてオリゴ糖を合成し(糖1分子を伸長させるためには、理論上1分子のATPが必要である)、児に与えている。それには何らかの生理的意義があつて然るべきである。

我々は2003年に、ビフィズス菌が母乳オリゴ糖を分解するための特異的な酵素群を有していることを発見した。それ以降、乳児型ビフィズス菌におけるユニークな母乳オリゴ糖資化経路に着目して、その経路上の酵素の構造機能解析を行ってきた。興味深いことに、これらの酵素群のほとんどは乳児型ビフィズス菌にのみ存在しており、他の腸内細菌には見られない。

2. 研究の目的

本研究では、母乳オリゴ糖資化経路上にあるグリコシダーゼのうち、特にラクト-N-ビオシダーゼおよびフコシダーゼに着目して、その生理機能解析・構造機能解析を行うと共に、改変酵素を利用した母乳オリゴ糖の精密酵素合成に取り組んだ。また、乳児糞便中DNAの遺伝子解析を行うことで、これらグリコシダーゼのビフィズスフローラ形成への関与を調べた。

また、母乳オリゴ糖の主要成分であるラクト-N-テトラオースの精密合成法を開発することを試みた。

3. 研究の方法

ラクト-N-ビオシダーゼに関しては、大腸菌における組換え発現株を作製して精製を行い、酵素化学的な解析を行うとともに、X線結晶構造解析を行った。フコシダーゼに関しては、グリコシダーゼ化への変換を行う目的で、80種以上のアミノ酸置換体を作製して評価を行った。また、母乳や乳児糞便は京都府内の助産院の協力で回収して解析に使

用した。

ラクト-N-テトラオースの合成は、ホスホリラーゼの機能改変によって行った。

4. 研究成果

a) ラクト-N-ビオシダーゼについて

ラクト-N-ビオシダーゼのうち、LnbBおよびLnbXの2種について酵素機能解析を行うとともに、X線結晶構造解析を行った。その結果、両酵素の触媒機構や基質認識機構の差異を明らかとすることに成功した。LnbBは、N-アセチルヘキササミニダーゼが多く分類されている糖質分解酵素ファミリー(GH) 20に属しており、基質結合ポケットを+サブサイト側へ広げることで、ラクト-N-ビオースという2糖構造を認識可能となっていた。一方、LnbXはGH20とは異なりβ-ヘリックス構造をとっており、表面付近の少し窪んだポケットにおいてラクト-N-ビオース構造を認識していた。この結果から、LnbXは新規な糖質分解酵素ファミリー(GH) 136として登録された。乳児腸管という同じ環境下で、同じ母乳オリゴ糖の選択圧を受けながらも、ビフィズス菌が全く異なる2種の酵素ラクト-N-ビオシダーゼを進化させてきたことは非常に興味深い。

次に、完全母乳栄養児($n = 10$)および混合母乳栄養児($n = 6$)の糞便を回収してDNAを抽出し、遺伝子解析を行った。その結果、完全母乳栄養児においてビフィズス菌占有率が有意に高いこと、なかでも*B. longum*が多いことが明らかとなった。そこで、*B. longum*に特異的な*lnbX*遺伝子のコピー数を調べたところ、完全母乳栄養児の糞便DNAにおいて有意にコピー数が高いことを見出した。また、*B. longum*細胞数と*lnbX*遺伝子のコピー数に有意ではないものの正の相関がみられた。このような相関は、混合母乳栄養では見られなかった。

このことから、母乳栄養児におけるビフィズス菌叢形成に、LnbXが重要な役割を果たしていることが明らかとなると共に、ビフィズス菌とヒトが母乳オリゴ糖を介して共進化してきたことが伺えた。

b) フコシダーゼについて

フコシダーゼの活性中心はN421、N423、E566、D766の4残基から形成されている。D766によって活性化されたN423が塩基触媒として、E566が酸触媒として機能しており、N421はN423とともにFucのC1を攻撃する水を保持している。N421、N423、D766残基にサチュレーション変異を導入し、FucFをドナー基質、Lacをアクセプター基質としてシダーゼ活性を測定したところ、N423H置換体が高いシダーゼ活性を有することを見出した。また、至適条件下では、Fuc-Fに対して80%以上の効率で、Galの2位の水酸基に位置特異的に転移反応を触媒した。また、本変異体を

用ラクトースやラクト-*N*-テトラオースなどのオリゴ糖のみならず、ムチンなどの糖タンパク質糖鎖にも H-抗原(Fuca1-2Gal)を導入可能であることを示した。ただ、FucFの水溶液中での半減期が20分程度と非常に短かったことから、実用的な合成法とはなりにくいことが明らかとなった。

c) ラクト-*N*-テトラオースの精密合成について

結晶構造が既に明らかとなっていた2糖特異的ホスホリラーゼの活性ポケットに変異を導入することでラクト-*N*-テトラオースを合成することを試みた。まず活性中心にラクト-*N*-テトラオースを組込んだモデルを作製したところ、ラクトース部位がループ構造と衝突していることが予測された。そこで、このループ部位を欠失させて、代わりに他のアミノ酸を3個から7個挿入した変異体を作製したところ、ラクト-*N*-テトラオースホスホリラーゼ活性を示すようになった。さらにサチュレーション変異を導入して、それらの変異体の活性を調べ、これらの変異体を精製して諸性質を決定するとともに、逆反応を用いてGal-1-Pおよびラクト-*N*-トリオースIIからラクト-*N*-テトラオースが合成可能であることを証明した。なお、合成反応時に生じるリン酸をスクロースホスホリラーゼによって消費することで反応平衡を傾けた場合、反応液中のラクト-*N*-トリオースIIの95%以上が消費されて、ラクト-*N*-テトラオースへと変換された。現在、スケールアップを目指している。

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)

- (1) Viborg AH, Katayama T, Arakawa T, Abou Hachem M, Lo Leggio L, Kitaoka M, Svensson B, and Fushinobu S. (2017). Discovery of α -L-arabinopyranosidases from human gut microbiome expands the diversity within glycoside hydrolase family 42. *Journal of Biological Chemistry* 292: 21092-21101. doi: 10.1074/jbc.M117.792598.
- (2) Katoh T, Maeshibu T, Kikkawa K, Gotoh A, Tomabechei Y, Nakamura M, Liao WH, Yamaguchi M, Ashida H, Yamamoto K, and Katayama T. (2017). Identification and characterization of a sulfoglycosidase from *Bifidobacterium bifidum* implicated in mucin glycan utilization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81:2018-2027. doi: 10.1080/09168451.2017.1361810.
- (3) Gotoh A, Nara M, Sugiyama Y, Sakanaka M, Yachi H, Kitakata A, Nakagawa A, Minami H, Okuda S, Katoh T, Katayama T, and Kurihara S. (2017). Use of Gifu anaerobic medium for culturing 32 dominant species of human gut microbes and its evaluation based on short-chain fatty acids fermentation profiles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81:2009-2017. doi: 10.1080/09168451.2017.1359486.
- (4) 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*. (2017). *Cell Chemical Biology* 24: 515-524. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.03.012.
- (5) Sugiyama Y, Katoh T, Honda Y, Gotoh A, Ashida H, Kurihara S, Yamamoto K, and Katayama T. Application study of 1,2- α -L-fucosynthase: Introduction of Fuca1-2Gal disaccharide structures on N-glycan, ganglioside, and xyloglucan oligosaccharide (2016). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81:283-291. doi: 10.1080/09168451.2016.1254532.
- (6) Katoh T, Katayama T, Tomabechei Y, Nishikawa Y, Kumada J, Matsuzaki Y, and Yamamoto K. (2016). Generation of a mutant *Mucor hiemalis* endoglycosidase that acts on core-fucosylated N-glycans. *Journal of Biological Chemistry*. 291: 23305-23317. doi: 10.1074/jbc.M116.737395
- (7) Sugiyama Y, Gotoh A, Katoh T, Honda Y, Yoshida E, Kurihara S, Ashida H, Kumagai H, Yamamoto K, Kitaoka M, and Katayama T. (2016). Introduction of H-antigens into oligosaccharides and sugar chains of glycoproteins using highly efficient 1,2- α -L-fucosynthase. *Glycobiology* 26:1235-1247. doi: 10.1093/glycob/cww085.
- (8) Hattie M, Ito T, Debowski AW, Arakawa T, Katayama T, Yamamoto K, Fushinobu S, and Stubbs KA. (2015). Gaining insight into the catalysis by GH20 lacto-*N*-biosidase using small molecule inhibitors and structural analysis. *Chemical Communications (Cambridge)*. 51:15008-15011. doi: 10.1039/c5cc05494j.
- (9) 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.
- (10) Shimada Y, Watanabe Y, Wakinaka T, Funeno Y, Kubota M, Chaiwangsri T, Kurihara S, Yamamoto K, Katayama T, and Ashida H. (2015). α -*N*-Acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* specifically hydrolyzes α -linked *N*-acetylglucosamine at nonreducing terminus of *O*-glycan on gastric mucin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:3941-3948.
doi: 10.1007/s00253-014-6201-x

[学会発表](計 16 件)

- (1) Katayama, T. (招待講演) Symbiosis and co-evolution between breast-fed infants and *Bifidobacterium* driven by human milk oligosaccharides and their degrading enzymes. The 26th Gut microflora symposium. Development of Intestinal Microbiota and Human Diseases. How do diet, nutrition and drugs affect them? October 27th, 2017 (Tokyo). (招待講演)
- (2) Katayama, T. (招待講演) Molecular insight into symbiosis and co-evolution between infants and bifidobacteria. The 19th Japanese and German Workshop on Enzyme Technology. September 21st, 2017 (Rostock).
- (3) Katayama, T. (招待講演) Unique carbohydrate metabolism in bifidobacteria –Human milk oligosaccharides as the bifidus factor?-. JSPS France Japan Joint Forum. Science of Fermentation –an authentic innovation from ancient time-. November 4th. 2015. (Dijon).
- (4) 片山高嶺. (招待講演) 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. 第15回 糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム拡大を続けるグライコサイエンス: 基礎・応用生物学から健康・医療まで. 2017年10月26日(九州).
- (5) 片山高嶺. (招待講演) 酵素機能から考える乳児とビフィズス菌の共生・共進化. 関西グライコサイエンスフォーラム. 2017年5月13日(京都).
- (6) 片山高嶺. (招待講演) 母乳オリゴ糖とビフィズス菌 - 共生と共進化 -. 第 109 回発酵学懇話会「腸内フローラ研究の新展開」. 2016年8月26日(大阪).
- (7) 片山高嶺. (招待講演) ビフィズス因子としての母乳オリゴ糖. 第33回日本微量栄養学会学術集会. 2016年6月25日(京都).
- (8) 片山高嶺. (招待講演) 微生物酵素から考える腸内細菌とヒトの共生～ビフィズス菌と母乳オリゴ糖～. 日本農芸化学会2016年度大会シンポジウム. 2016年3月29日(札幌).
- (9) 片山高嶺. (招待講演) ビフィズス菌と母乳オリゴ糖～ビフィズスフローラ形成の分子機序解明を目指して～. 日本農芸化学会第25回産学官若手交流会さんわか「産学官でつなぐ糖鎖工学の現状」. 2015年12月3日(京都).
- (10) 片山高嶺. (招待講演) カギの穴から天を覗く～ビフィズス菌酵素から考えるヒトとの共生～. 日本乳酸菌学会2015年度秋期セミナー「乳酸菌・常在細菌と宿主の相互作用～細菌の機能から迫る宿主との関係性～」. 2015年11月27日(東京).
- (11) 片山高嶺. (招待講演) ヒトミルクオリゴ糖と乳児型ビフィズス菌～共生と共進化～. 酪農科学シンポジウム「21世紀ミルクサイエンスのブレークスルーをめざして」. 2015年9月24日(帯広).
- (12) 後藤愛那・岸野重信・岡田奈津実・廣瀬潤子・栗原新・加藤紀彦・奥田修二郎・片山高嶺・小川順. (一般講演) 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(神戸).
- (13) 丹沢充裕・加藤紀彦・片山高嶺. (一般講演) *Bifidobacterium bifidum* 由来 1,2-L-フコシダーゼの N 末端機能未知ドメインの解析. 2017年度生命科学系学会合同年次大会(神戸).
- (14) 阪中幹祥・石田卓也・佐藤真与・谷内寛之・阿部紘一・前田信悟・吹谷智・横田篤・栗原新・荒川孝俊・五十嵐圭日子・伏信進矢・片山高嶺. ビフィズス菌における galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose I トランスポーターの多様性解析: 母乳オリゴ糖 lacto-*N*-tetraose の取込みに寄与するアミノ酸配列の発見. 2017年度乳酸菌学会(福岡県宗像市).
- (15) 後藤愛那・山田千早・苜米地祐輔・廣瀬潤子・朝隈貞樹・浦島匡・北岡本光・栗原新・山本憲二・原田岳・何方・加藤紀彦・片山高嶺. *Bifidobacterium bifidum* 菌株間におけるヒトミルクオリゴ糖資化様式および関連酵素の保存性. 日本農芸化学会2017年度大会(京都).
- (16) 加藤紀彦・前洪貴子・吉川慶一・後藤愛那・山口真範・芦田久・山本憲二・片山高嶺. ムチンの硫酸化糖鎖に作用するビフィズス菌由来スルフォグリコシダーゼ. 第18回関西グライコサイエンスフォー

ラム.H29.05.13 京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:

発明者: 片山高嶺・加藤紀彦・北岡本光

権利者: 京都大学・農研機構

種類: 特許出願

番号: 特願 2018-157840

出願年月日: 平成 30 年 8 月 24 日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔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)研究代表者

片山 高嶺 (KATAYAMA Takane)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号: 7 0 3 4 6 1 0 4

(2)研究分担者

日高 將文 (Hidaka Masafumi)

東北大学・(連合)農学研究科・助教

研究者番号: 0 0 5 8 4 8 4 8

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: 4 0 3 8 1 9 1 7

栗原 新 (KURIHARA Shin)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号: 2 0 6 3 0 9 6 6

(3)連携研究者

該当なし

()

研究者番号:

(4)研究協力者

該当なし

()