

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06581

研究課題名(和文) ビフィズス菌の糖質分解酵素を介した新規定着メカニズムの解析

研究課題名(英文) Characterization of bifidobacterial glycosidase: a new colonization factor that promotes bacterial adhesion to the intestinal mucin

研究代表者

西山 啓太 (Nishiyama, Keita)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：40756029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ビフィズス菌は、ヒト消化管に生息する共生細菌である。本研究では、*Bifidobacterium bifidum*のシアリダーゼ(SiaBb2)に着目し、付着因子と栄養獲得因子の両面からその役割について解析した。本研究から、SiaBb2がHMOに含まれるシアル化糖鎖を切断することで効率的な糖の資化を可能にしていること、さらにSiaBb2が*B. bifidum*のムチンに対する付着性を促進することを見出した。これらは、シアリダーゼが腸管付着性と栄養獲得というビフィズス菌の生存に重要な役割を担う二機能性の因子であることを示しており、SiaBb2を介した新たな定着機構の存在を示すものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bifidobacterium is a natural inhabitant of the human gastrointestinal tract. I studied the role of sialidase (SiaBb2) from *Bifidobacterium bifidum* in gut colonization and carbohydrate catabolism. SiaBb2 cleaves sialyl-human milk oligosaccharides to produce usable oligosaccharides, thus supporting *B. bifidum* growth. Moreover, SiaBb2 promotes *B. bifidum* adhesion to mucosal surfaces. This study provides new insights into the role of *B. bifidum* sialidase as a bifunctional extracellular enzyme that is crucially important for *B. bifidum* colonization of the gut.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌 定着 プロバイオティクス 付着因子 ムチン ミルクオリゴ糖 シアリダーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

プロバイオティクスによる保健的効果は広く注目されてきた。とりわけ、*Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属が多用されており、有用性とその作用機序が明らかにされつつある。これらの細菌は、宿主腸管に付着することで腸管内での長期の定着を可能とし、効果的な有用性を発揮出来ると考えられてきた。これらは、申請者の一連の研究により証明されており、*Lactobacillus* 属細菌（乳酸菌）は、菌体表層に幾つかの腸管付着因子を有し、これを介した宿主受容体に対する付着機構をもつこと (Nishiyama et al., PLoS One, 2013)、さらに、見出された付着特性を利用し、乳酸菌による病原細菌の感染阻害効果を証明している (Nishiyama et al., PLoS One, 2014)。したがって、付着機構の解析は、腸内環境における生存戦略の解明、さらにはプロバイオティクスとしての利用面からも本研究分野の重要項目のひとつに挙げられる。

*Bifidobacterium* 属細菌（ビフィズス菌）は乳幼児から成人の大腸に広く棲息し、乳幼児では細菌叢の 90%以上を占めるヒト共生細菌である。しかしながら、付着機構の解析をはじめとした学術的研究は遅れている。そこで、申請者は *Bifidobacterium bifidum* の有するシアリダーゼに着目した。これまでビフィズス菌の菌体表層のシアリダーゼは、難分解性のシアリ化されたミルクオリゴ糖やムチン糖鎖を加水分解することでこれらの資化を可能とし、糖源の少ない大腸で優先的に生育する為の栄養獲得因子として役割を担うと推測されてきた (Kiyohara et al., Glycobiology, 2011)。一方、肺炎連鎖球菌などの病原細菌においてシアリダーゼの宿主定着への関与が報告されている (Uchiyama et al., J. Exp. Med., 2009)。しかし、ビフィズス菌において付着性の観点から本酵素の役割は全く解析されていない。以上より、申請者は、シアリダーゼが腸粘膜への付着性を促進するという仮説に基づき、シアリダーゼの栄養獲得因子としての役割に加え、腸管付着因子としての機能性に関して解析することを立案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、*B. bifidum* の腸管定着におけるシアリダーゼの機能的役割を明らかにすることを目的とした。すなわち、シアリダーゼ遺伝子破壊株の取得を基盤とした分子細菌学的手法による解析から栄養獲得因子と付着因子としての役割を明らかにすると共に、組換えタンパク質を用いた解析からその結合メカニズムの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

*B. bifidum* におけるシアリダーゼ (SiaBb2) の栄養獲得因子及び付着因子としての役割

を解析するため、次に示す項目について研究を実施した。

### (1) *B. bifidum* ATCC 15696 の *siaBb2* 破壊株の作出

*B. bifidum* ATCC 15696 の *siaBb2* 破壊株は、pBS423- $\Delta$  *repA* (Hirayama et al., Appl Environ Microbiol, 2012) を用いて、*siaBb2* の部分配列を組換え領域として pBS423- $\Delta$  *repA* に構築し、一点相同組換え法により作製した。さらに、改変 pKKT427 に *siaBb2* をクローン化し *siaBb2* 破壊株に導入し相補株を作製した。

### (2) *siaBb2* 破壊株の糖資化性及び付着性の評価

*siaBb2* 破壊株を用いて、ヒトミルクオリゴ糖 (HMO) の資化性と腸粘液ムチンに対する付着性を評価した。

① ミルクオリゴ糖の資化能の評価：糖資化の評価は、Asakuma et al., J Biol Chem, (2011) に従い実施した。糖源を除いた MRSCS 培地に糖源として HMO または 6' Sialyl-lactose を 1% (w/v) 添加し、経時的に濁度 (OD<sub>660</sub>) を測定し生育を評価した。

② 腸粘液ムチンに対する付着性の評価：粘液分泌型ヒト結腸由来細胞 (HT29-MTX-E12) に対して付着した *B. bifidum* ATCC 15696 をコロニーカウント法により測定した。また、ムチンに対する付着性は、ブタ大腸 (十和田地区食肉処理場より入手) から高純度に精製したブタ大腸ムチン (PCM) をスライドガラスに固定し、付着菌数を顕微鏡下でカウントした。

### (3) SiaBb2 組換えタンパク質を用いた結合領域とエピトープ解析

SiaBb2 の結合領域を明らかにするため、pET28b に *siaBb2* をクローン化し、*Escherichia coli* BL21 (DE3) を宿主として N 末端 His タグ融合タンパク質 (His-SiaBb2) を発現させた。また、インバース PCR により His-SiaBb2 を元に各領域の欠損変異タンパク質を作製した (図 3 参照)。各変異タンパク質の PCM に対する結合性は、ELISA により評価した。また、酵素活性阻害剤を添加した際の結合性も解析した。さらに、糖鎖アレイシステムを用いて SiaBb2 の受容体の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *B. bifidum* ATCC 15696 の糖資化性における SiaBb2 の役割

*B. bifidum* ATCC 15696 *siaBb2* 破壊株及び *siaBb2* 相補株を作出した。続いて、HMO または 6' SL を糖源として添加した場合の *B. bifidum* ATCC15696 (野生株、*siaBb2* 破壊株、*siaBb2* 相補株) の生育を評価した (図 1)。MRSCS 培地では、全ての菌株が同様の増殖パターンを示した。HMO を糖源とした場合、野

生株と比較し *siaBb2* 破壊株の増殖は培養開始 12 時間以降に顕著な遅れが認められた。一方, *siaBb2* 相補株では増殖の遅れは中程度に回復した。さらに 6' SL を糖源とした場合, *siaBb2* 破壊株の増殖は殆ど認められず, *siaBb2* 相補株では野生株と同程度の増殖が認められた。以上より, SiaBb2 が *B. bifidum* によるシアルオリゴ糖の資化性に重要な役割を持つことが示された。

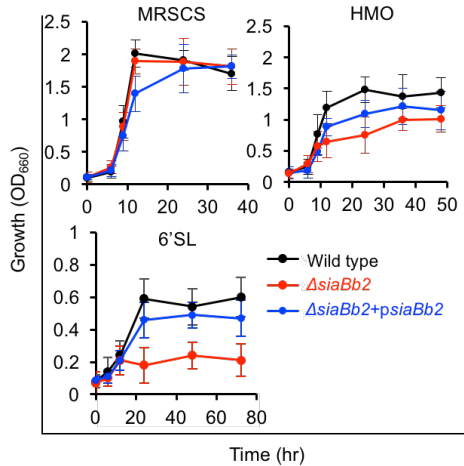


図 1. *B. bifidum* ATCC 15696 の生育試験  
1% (w/v)HMO または 6' SL を糖源として添加した場合の *B. bifidum* ATCC15696 (野生株, *siaBb2* 破壊株, *siaBb2* 相補株) の生育を濁度 (OD<sub>660</sub>) 測定により評価した (n=3)。

(2) *B. bifidum* ATCC 15696 の付着性における SiaBb2 の役割

HT29-MTX-E12 及び PCM に対する *B. bifidum* ATCC15696 の付着性の評価を行なった (図 2)。HT29-MTX-E12 に対する付着性は, 野生株と比較し *siaBb2* 破壊株で有意 ( $p < 0.05$ ) に低下したが, *siaBb2* 相補株では付着性が回復した。また PCM への付着性に対する SiaBb2 の寄与はより顕著であり, 野生株と比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に低下したが, *siaBb2* 相補株では付着性が回復した。

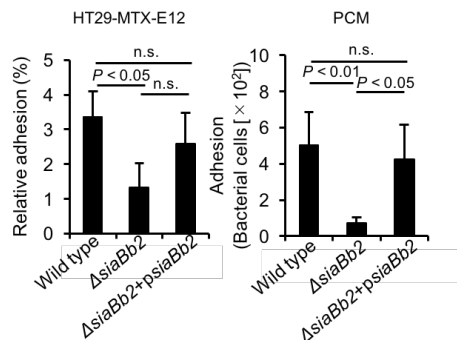


図 2. *B. bifidum* ATCC 15696 の付着性試験  
ヒト結腸由来粘液分泌細胞 (HT29-MTX-E12) 及びブタ結腸ムチン (PCM) に対する *B. bifidum* ATCC15696 (野生株, *siaBb2* 破壊株, *siaBb2* 相補株) の付着性評価した (n=5)。

さらに, シアリダーゼ活性を持たない *Bifidobacterium longum* に SiaBb2 を発現させ PCM に対する付着性を評価したところ, SiaBb2 発現株において顕著な付着の増加が認められた。以上から, SiaBb2 は, 消化管粘液に対する *B. bifidum* の付着因子として機能することが示された。

(3) SiaBb2 タンパク質の付着因子としての機能特性

His-SiaBb2 組換えタンパク質の PCM に対する結合性を ELISA により評価した。His-SiaBb2 は添加量依存的な結合性を示した (図 3)。一方, Sialidase domain を欠失した His- $\Delta$ Sia では PCM に対する結合性は認められなかったが, Sialidase domain のみを発現させた His-Sia では全長と同様の結合性が認められた (図 3)。以上より, SiaBb2 の結合には Sialidase domain が必須であると考えられた。興味深いことに, 酵素活性阻害剤 Neu5Ac2en の添加によって His-Sia の PCM に対する結合性は殆ど影響を受けなかったことから, 切断と結合は異なる機序で生じることが示唆された。すなわち, SiaBb2 の結合エピトープはシアル酸以外の糖鎖に対しても相互作用することが推察された。

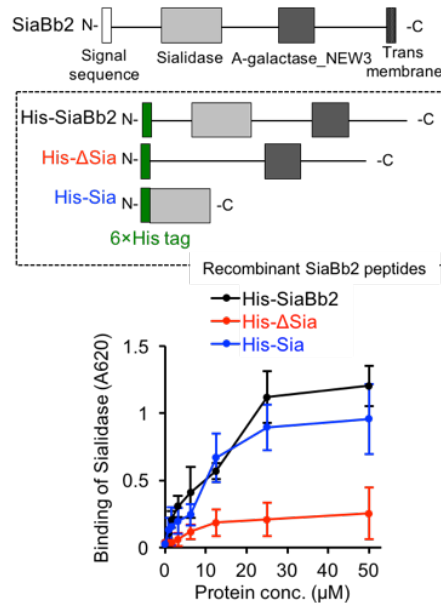


図 3. SiaBb2 タンパク質の結合試験

各領域を欠損した His タグ融合 SiaBb2 タンパク質を発現, 精製した。ブタ結腸ムチンに対する各タンパク質の結合性は ELISA により評価した (n=3)。

次に糖鎖アレイを用いて His-Sia が相互作用可能な糖鎖構造の探索を試みた。その結果, His-Sia は幾つかの糖鎖構造に対して結合したが (図 4 a, b), 特に末端に 6'-シアルガラクトースを含む糖鎖と A 抗原糖鎖に対して高い結合性を示した (図 4 c)。さらに, 表面プラズモン原理を利用した Biacore によ



析. 石川県立大学・第5回 腸内細菌共生機構学特別セミナー, 2016年1月, 石川県立大学(石川県野々市市).

- ⑥ 西山啓太, 向井孝夫, 腸粘膜への付着性を有する乳酸菌による病原微生物の感染予防とその作用機序を考える. 平成27年度 酪農科学シンポジウム, 2015年9月, 帯広市・とかちプラザ(北海道帯広市).
- ⑦ 上野慎太郎, 西山啓太, 仲又幸一, I. Nengah Sujaya, 福田健二, 浦島匡, 山本裕司, 向井孝夫, *Lactobacillus rhamnosus* における mucus-binding factor と Spa 線毛の粘膜付着性の評価. 日本乳酸菌学会 2015年度大会, 2015年7月, 和洋女子大学(千葉県市川市).
- ⑧ 西山啓太, 篠原有香, 浦島匡, 吹谷智, 横田篤, 山本裕司, 向井孝夫, ビフィズス菌におけるシアリダーゼのムチン付着因子としての新たな役割, 日本乳酸菌学会 2015年度大会, 2015年7月, 和洋女子大学(千葉県市川市).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

北里大学薬学部微生物学教室 (<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microbiology/>)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西山 啓太 (Nishiyama Keita)  
北里大学・薬学部・助教  
研究者番号: 40756029

### (2) 研究協力者

- ・岡田 信彦 (Okada Nobuhiko)  
北里大学・薬学部・教授
- ・向井 孝夫 (Mukai Takao)  
北里大学・獣医学部・教授
- ・山本 裕司 (Yamamoto Yuji)  
北里大学・獣医学部・講師
- ・横田 篤 (Yokota Atsushi)  
北海道大学・農学部・教授
- ・吹谷 智 (Fukiya Satoru)  
北海道大学・農学部・講師
- ・浦島 匡 (Urashima Tadasu)  
帯広畜産大学・畜産学部・教授