

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06374

研究課題名(和文) 硫酸化ムチン結合性ビフィズス菌の腸管バリア機能に及ぼす影響と腸内定着機構の解析

研究課題名(英文) Effects of sulfomucin-binding bifidobacteria on intestinal barrier function and analysis of gut colonization mechanisms

研究代表者

向井 孝夫 (MUKAI, TAKAO)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：20229917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、硫酸化糖結合性Bifidobacterium breveのバリア増強機能や腸内定着機構の一端を明らかにするため、硫酸化糖鎖にアフィニティーを有すると考えられる硫酸化糖代謝系に着目し、硫酸化糖鎖結合タンパク質を見出すこととした。データベース検索の結果、複数のスルファターゼや取り込みにかかわる遺伝子が見出された。本研究では酵素学的手法によって主要なスルファターゼと活性化酵素を特定した。硫酸化糖鎖への結合には硫酸化糖のトランスポーターが寄与している可能性が考えられた。推定トランスポーター遺伝子は特定されたスルファターゼ遺伝子上流に存在したため、現在その遺伝子の欠損株を作製中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B. breveは哺乳開始直後の乳児腸内に定着するビフィズス菌の一種であり、その後の腸管バリア機能や腸管免疫機能の発達に重要な役割を發揮していると考えられているが、なぜ、本菌種がその時期に定着するのは、十分に理解されていない。先行研究では、共生関係にあるB. bifidumからミルクオリゴ糖やムチン糖鎖分解物である硫酸化糖を得ることが哺乳初期での定着要因の一つとされているため、本菌が第一に硫酸化糖鎖に結合することが重要であると考えている。現在まで、硫酸化糖鎖結合メカニズムの完全解明には至っていないが、もし、解明されれば人工乳を授乳している乳児腸内に本菌を定着させることの一助になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to clarify the barrier-enhancing function of sulfated sugar-binding Bifidobacterium breve and part of the adhesion mechanism to the mucosa, we focused on the sulfated sugar metabolism system, which is thought to have affinity for sulfated sugar chains, to find sulfated sugar chain binding proteins. As a result of database search, several sulfatases and genes involved in the uptake were found. In this study, we identified major sulfatases and activating enzymes by enzymatic methods. It was hypothesized that sulfated sugar transporters may contribute to binding to sulfated sugar chains. Since the putative transporter gene was located upstream of the identified sulfatase gene, we are now producing a strain deficient in the gene.

研究分野：動物微生物学

キーワード：ビフィズス菌 ムチン 硫酸化糖鎖

1. 研究開始当初の背景

ヒトや動物の腸内には 500 種類、100 兆個を超える多種多様な細菌が棲息していると考えられており、一定のバランスが保たれた生態系が作り上げられ、いわゆる腸内細菌叢を形成している。腸内細菌叢の解析技術がこの数年で劇的に発展し、細菌叢の全体像が明らかにされつつある。その結果、腸内細菌叢を構成している菌叢の変化、換言すれば正常な腸内細菌叢の破たんが、種々の疾病の原因になっていることが示唆されつつある。特に正常な腸内細菌叢の破たんが肥満の要因となることが報告され注目されている。すなわち、一部の腸内細菌がエネルギー調節や栄養摂取のエネルギー恒常性維持に寄与しており、Firmicutes 門に対する Bacteroidetes 門に属する細菌種の比率が低下すると肥満が誘導されることが報告されている¹⁾。また、「肥満型」の腸内細菌叢の中では、炎症や DNA 損傷作用が示されている硫化水素を産生する細菌種が特異的に増加する²⁾。

一方で、肥満になると腸管粘膜バリア機能が低下し、腸内細菌由来グラム陰性菌の細胞壁リポ多糖 (LPS) が、低濃度のレベルで血中へ持続的に移行することが示唆されている³⁾。正常な腸内細菌叢が破たんし肥満が誘導されると、粘膜バリア機能が低下し、全身的な慢性炎症が亢進され、結果として動脈硬化やがんなど生活習慣病やストレス性疾患が増悪することが強く推察される。

ビフィズス菌は消化管下部に棲息する偏性嫌気性グラム陽性桿菌であり、オリゴ糖をはじめとする様々な糖の代謝系を有している。また、ビフィズス菌はその棲息環境からヒト常在性ビフィズス菌 (Human-Residential Bifidobacteria, HRB) とそれ以外のビフィズス菌 (non-HRB) に分類される。これまで HRB は 10 菌種程度見出されているが、離乳期前後で検出されるビフィズス菌種は劇的に置き換わり、授乳期に検出される乳児型と離乳期以降検出される成人型に分けられる。乳児型ビフィズス菌として、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*、*Bifidobacterium bifidum* の 3 菌種が知られている^{4), 5)}。このようにビフィズス菌が乳児型と成人型に分類できる理由は、栄養源が制限された環境において、宿主由来のムチンやヒトの母乳に含まれる難消化性のヒトミルクオリゴ糖 (HMO) などを糖源として利用していることが一因とされている⁶⁾。

これまで乳児型ビフィズス菌 3 菌種間で HMO やムチン糖鎖を介したクロスフィーディングによる共生関係が成り立っていることが明らかにされている。*B. bifidum* はこれまで多くの HMO を分解する酵素を菌体外に発現している。一方で、低分子化された多数のオリゴ糖は *B. infantis* や *B. breve* で利用される。すなわち、*B. infantis* や *B. breve* は菌体外に糖分解酵素は発現しておらず、すべて菌体内に糖分解酵素を発現している。したがって、これら 2 菌種においては糖トランスポーターの有無が HMO の利用性の重要な因子となっていると推察されてきた⁷⁾。

研究代表者はすでにビフィズス菌が腸内に定着するための一つの因子としてムチン糖鎖に付着することが重要な要因となっていることを明らかにしている⁸⁾。また、硫酸化糖鎖結合性を有するビフィズス菌を食事誘導性肥満マウスに投与したところ、腸管透過性の亢進を抑制する傾向を示唆してきた⁹⁾。硫酸化ムチンは腸上皮ムチンの主要糖鎖であることが示されていることや HMO にも硫酸化オリゴ糖が存在することが示唆されている。したがって、硫酸化糖鎖に結合性を有することあるいは代謝できるビフィズス菌は、腸内定着性や腸管バリア機能の安定化に大きく寄与できる可能性が強く推察された。

2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌叢の恒常性を維持することが、肥満や生活習慣病やそれらが引き金となる慢性炎症や老化の予防に繋がるであろうとの仮説を立て、申請者がすでに見出してきた硫酸化ムチン結合性ビフィズス菌を活用して腸内細菌叢の恒常性を維持することで、慢性炎症に起因する疾病を予防できるものと考え以下目的で研究を進めた。

(1) 高脂肪摂取やそれによる腸内胆汁酸の増加を介した腸管バリア機能低下に特定の腸内細菌が寄与していることを明らかにする。

具体的には、高脂肪食摂取時の腸管バリア機能低下のメカニズムを明らかにするため、高脂肪摂取により腸管で増加することが示唆されている胆汁酸の主成分であるコール酸 (CA) とデオキシコール酸 (DCA) に注目し腸内環境に及ぼす影響を評価した。

(2) ビフィズス菌 (*B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum*) の硫酸化糖鎖結合タンパク質を見出すことを目的とした。生化学的手法では目的タンパク質を取得することはできなかった。そこで硫酸化糖鎖にアフィニティーを持つタンパク質としてスルファターゼに着目して研究を進めることとした。

3. 研究の方法

(1) 供試動物は、C57BL/6J マウスのオスの 6 週齢 (日本チャールス・リバー株式会社) を用いた。飼料は標準食 (AIN93M, Research Diets) と標準食 1 kg に対して CA または DCA 0.5 g を添加することで調製した CA 添加食と DCA 添加食の 3 種類を用意し、飲料水として抗生物質を加えたものと水道水の 2 種類を用いた。無作為抽出法により標準食給餌区 (N 区, n=6)、標準食給餌+抗生物質飲水投与区 (N/AB 区, n=6)、CA 食給餌区 (CA 区, n=6)、CA 食給餌+抗生物質飲水投与区 (CA/AB 区, n=6)、DCA 食給餌区 (DCA 区, n=6)、DCA 食給餌+抗生物質飲水投与区 (DCA/AB 区, n=6) の 6 区に分けて、5 週間飼育した。飼育開始 0 週および 5 週に解剖を行った。を用いた腸管透過性は FITC-dextran を投与することで評価した。本飼育 0 週間目と 3 週間目のマウスに蛍光物質である Fluorescein

isothiocyanate-dextran average mol wt 4,000 を一匹当たり 600 mg/gBW になるように胃ゾンデを用いて経口投与を行った。1.5 時間後に尾静脈から採血を行い 3,000 rpm、10 分間、4℃で遠心分離を行った。得られた血漿は PBS と 1:3 で希釈し、Nunc® MicroWell™ 96-Well Plates (Thermo Scientific) に 100 µl ずつ加え、蛍光分光光度計(Thermo Scientific)を用いて励起波長:485 nm、蛍光波長:535 nm で測定を行った。

(2) 3 菌種のゲノムデータベースを検索したところ、*B. breve* に複数のスルファターゼ遺伝子と活性化酵素遺伝子が見出された。これらの組み換えタンパク質を作製し、酵素活性を評価することで真のスルファターゼを見出すこととした。

4. 研究成果

(1) DCA 添加食給餌マウスにおける腸管透過性の評価
試験期間中の摂餌量および摂取エネルギー量に各投与区で差はみられなかった。体重の推移では飼育 4 日目まで抗生物質投与区で体重増加に遅れが見られたが、6 日目以降は他の区と同様に体重が増加した。5 週目における増体量では、N 区と比較し CA/AB 区で有意($p < 0.05$)な減少が認められた。FITC-dextran の経口投与 1 時間半後の血漿中 FITC-dextran 濃度の測定結果を Fig.1 に示した。4 週目において N 区と比較して CA 区で血漿中 FITC-dextran 濃度の増加傾向が認められた。一方で、DCA 区、DCA/AB 区ではいずれも腸管透過性の亢進は認められず、本実験におけるマウスの腸管透過性亢進においては DCA の直接的な作用が原因ではない可能性が示唆された。したがって、先行研究で示された高脂肪食給餌時に硫酸化糖鎖結合性ビフィズス菌によって腸管透過性の亢進が抑制した要因には、胆汁酸は影響していないものと推察された。

intestinal permeability (4week)

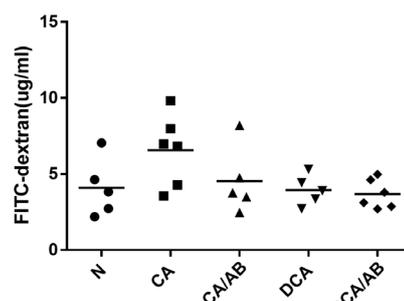


Fig.1 コール酸 (CA)、デオキシコール酸 (DCA) 添加食給餌および抗生物質投与 (AB) が腸管透過性へ与える影響

(2) *B. breve* におけるスルファターゼの探索

データベース検索から、Fig.2 に示したように 5 種類のスルファターゼ候補遺伝子および 2 種類のスルファターゼ活性化酵素の候補遺伝子が見出された。構造的な特徴から大きく 3 タイプに分けられることが明らかとなった。またすべてにおいてスルファターゼ活性発現に必要な共通配列(C/SxA/PxR)が確認された。

スルファターゼ活性発現確認のため、5 種類のスルファターゼ候補遺伝子を単独系および 2 種類の活性化酵素との共発現系の 2 種類の発現系を用いて His タグタンパク質を作製し、活性を評価した。予備的に精製前に祖酵素として活性を評価した結果、細胞膜結合型スルファターゼ 0510、細胞膜結合型スルファターゼ 1807 は、キナーゼ型スルファターゼ 1585 は、活性化酵素 0814 及び 0289 との共発現系において好気・嫌気状態どちらも安定した活性が得られなかった。一方、菌体内型スルファターゼ 0813 は、他のスルファターゼと比べ活性が著しく高くなった。活性化酵素 0289 との共発現系では好気状態において、単発現系より低い活性を示した。嫌気状態では顕著に活性が上昇した。活性化酵素 0814 との共発現系では好気・嫌気状態によらず、単発現系より高い活性を示した。また、菌体内型スルファターゼ 0291 は、0813 と比べどの発現系も全体的に活性が低かった。活性化酵素 0814、0289 両共発現系では、嫌気状態において活性化されることが示された。活性化酵素 0814 との共発現系では好気及び嫌気のどちらでも活性が高かった。そこで、活性の確認できた菌体内型スルファターゼ 0813 と 0291 の単独発現系および共発現条件下での発現

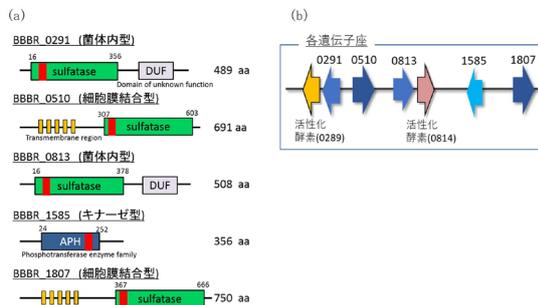


Fig. 2 *B. breve* におけるスルファターゼ候補遺伝子及びスルファターゼ活性化酵素候補遺伝子
(a) 各スルファターゼ候補遺伝子の推定構造 (b) *B. breve* ATCC15700における各遺伝子座及び周辺遺伝子

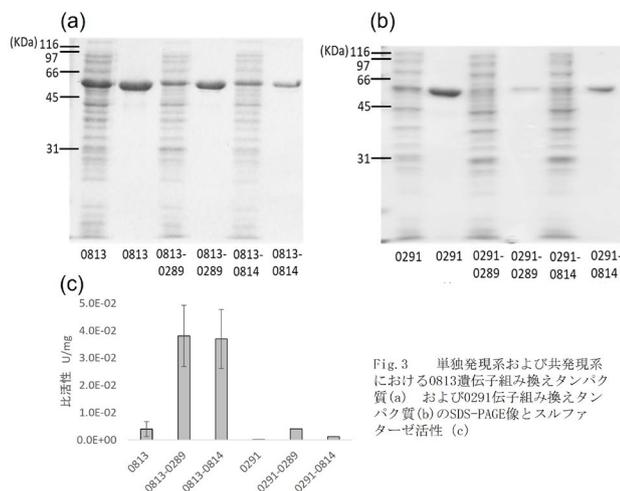


Fig. 3 単独発現系および共発現系における0813遺伝子組み換えタンパク質(a) および0291遺伝子組み換えタンパク質(b)のSDS-PAGE像とスルファターゼ活性(c)

タンパク質の精製を行ったところ、Fig,3 に示したように精製タンパク質が得られた。

次いで各精製タンパク質のスルファターゼ活性を測定した。0813 の単発現系に比べ、0813-0289 の共発現系では活性が 7.42 倍、0813-0814 の共発現系では活性が 9.42 倍程高くなった。また 0291 は単発現系に比べ、0291-0289 の共発現系では活性が 28.6 倍、0291-0814 の共発現系では活性が 8.52 倍程高くなった。また、0813 は 0291 に比べ顕著に日活性は高かった。以上から、本研究では5種類のスルファターゼが候補遺伝子として挙げられたが、主要なスルファターゼは、0813 遺伝子でコードされているタンパク質であることが判明した。

本研究で *B.breve* において主要なスルファターゼとして見出されたタンパク質はシグナル配列や膜結合ドメインは見出されなかったことから、菌体内発現していると推察された。本研究目的は硫酸化糖結合タンパク質としてスルファターゼに着目したが菌体内に発現しているため、硫酸化糖との相互作用には本酵素は寄与していないものと考えられた。そこで、現在、硫酸化糖トランスポーターに着目し、その遺伝子の特定とノックアウト株を作製して硫酸化糖との相互作用に寄与しているか否かを検討している。もし、硫酸化糖結合因子が解明されれば、本因子を有している菌株を腸内定着可能な菌株として積極的に利用することができる。

引用文献

- 1) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JL. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):480-4. doi: 10.1038/nature07540
- 2) Sakanaka, M., A. Gotoh, K. Yoshida, T. Odamaki, H. Koguchi, J.-Z. Z. Xiao, M. Kitaoka, and T. Katayama. 2020. Varied pathways of infant gut-associated *Bifidobacterium* to assimilate human milk oligosaccharides: Prevalence of the gene set and its correlation with bifidobacteria-rich microbiota formation. *Nutrients*. 12:1-21. doi:10.3390/nu12010071.
- 3) Hawkesworth S, Moore SE, Fulford AJ, Barclay GR, Darboe AA, Mark H, Nyan OA, Prentice AM. Evidence for metabolic endotoxemia in obese and diabetic Gambian women. *Nutr Diabetes*. 2013. 26;3(8):e83. doi: 10.1038/nutd.2013.24.
- 4) 堀米綾子, 小田巻俊孝. 2016. ビフィズス菌ゲノムサイエンスの現状と課題. *化学と生物*. 54:260-265.
- 5) Wong, C. B., H. Sugahara, T. Odamaki, and J. Z. Xiao. 2018. Different physiological properties of human-residential and non-human-residential bifidobacteria in human health. *Beneficial Microbes*. 9:111-122. doi:10.3920/BM2017.0031.
- 6) 藤田清貴. 2017. ビフィズス菌がもつ糖タンパク質糖鎖の分解代謝システム ビフィズス菌を増やすプレバイオティック糖タンパク質. *化学と生物*. 55:242-248.
- 7) 阪中幹祥. ヒト母乳オリゴ糖に高く適応しているビフィズス菌種 *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis*. *ミルクサイエンス*.70:158-163.
- 8) 西山啓太, 向井孝夫. 2018. ビフィズス菌と宿主腸粘膜との相互作用に関わる因子. *日本乳酸菌学会誌* 29:13-18.
- 9) 向井孝夫. 2017 年度科学研究費補助金 基盤研究(C)研究成果報告書.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------