

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15732

研究課題名(和文) ビフィズス菌による母乳脂質由来機能性物質の産生

研究課題名(英文) Production of functional substances derived from fatty acids in human milk fat by Bifidobacterium

研究代表者

後藤 愛那 (Gotoh, Aina)

京都大学・生命科学研究科・特別研究員 (PD)

研究者番号：60738384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：LAから変換されるHYAは、腸管バリア機能を向上させる機能が示されている。LAは母乳脂質にも多く含まれていることから、乳児糞便脂質の脂肪酸組成分析を行い、HYAが含まれることを示した。また、腸内細菌叢解析を行ったところ、母乳中LAから糞便中HYAへの変換率は、ビフィズス菌数と正相関していた。In vitro試験からも、Bifidobacteriumが確かに本変換反応を行うこと、精製酵素と遺伝子欠損株を用いて、変換酵素の活性を確認した。また、Bifidobacterium属であっても、種により変換能は大きく異なることが分かったが、乳児腸管内で多い種に関しては変換能が高い傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

宿主と腸内細菌の関係は、主にオミクスのアプローチから研究され、重要な知見がもたらされた。それらを基盤とし、疾病治療、健康機能食品への応用が広く期待されている。それに伴い、両者の関連を物質や遺伝子レベルのメカニズムとして説明することが求められるようになってきたが、従来のオミクス研究だけではその達成は難しい。

本研究は、ビフィズス菌という特定の菌種、母乳中のLAとHYAという特定の物質に絞った解析を行うものである。これは、宿主由来物質・菌・遺伝子・機能物質というそれぞれ具体的な因子を、一連のメカニズムとして明らかにしたものであり、今後の腸内細菌研究が目指すべき新しい形を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Breast-fed infants generally have gut microbiota dominated by bifidobacteria. However, reason of why humans have selected bifidobacteria remains unanswered. We analyzed oils of mother's milk and infant's feces, and showed that HYA, which stimulates epithelial barrier function, is detected in only infant's feces. We inferred that HYA was produced from conversion of LA, an essential fatty acid contained in breast milk, by gut microbes. Microbiota analysis revealed the strong correlation between the cell counts of genus Bifidobacterium and the conversion ratio of LA to HYA in infant stools. In addition, we demonstrated that Bifidobacterium and purified enzymes of Bifidobacterium convert LA to HYA in vitro assay. Interestingly, it was found that the conversion ability was different among the species. In human, infant-gut associated bifidobacterium grown by oligosaccharides may enhance HYA production, thereby fortifying the barrier function of intestinal cells of vulnerable infants.

研究分野：微生物学、分子生物学

キーワード：母乳 ビフィズス菌 HYA LA 脂質 腸管バリア機能

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳児腸管内ビフィズスフローラ

腸内細菌叢は、宿主の健康状態や疾病との関連が近年次々と明らかにされている (Karlsson FH *et al.*, 2013, Nature)。その組成変化が最も大きいのは授乳期であり、母乳栄養児の腸管では、授乳開始から数週間でビフィズス菌優勢な細菌叢(ビフィズスフローラ)が形成される。ヒトが、生物学的に未熟な乳児期にビフィズス菌を選択的に増殖させるということは、両者の共生関係・共進化の重要性を表している。そのため、「どのようにして」、そして「なぜ」ビフィズスフローラが形成されるのか、という2つの疑問は非常に興味を持たれてきたが、分子レベルでの詳細は長年解明されてこなかった。

(2) 母乳オリゴ糖によるビフィズスフローラ形成

第一の疑問である、「どのようにして」乳児腸管内でビフィズスフローラが形成されるか、という問いに対しては、ビフィズスフローラは離乳と共に消失することから、母乳中に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)が存在することが古くから指摘されてきた。申請者の所属する研究グループでは、これまでに母乳に含まれるオリゴ糖がビフィズス因子であることを明らかにした。母乳に含まれる糖のうち、最も多いラクトースは乳児自身が吸収してエネルギー源となるが、母乳オリゴ糖は膵消化酵素に耐性であるため、乳児の栄養にはならず大腸に到達する。大腸に生息するビフィズス菌は、母乳オリゴ糖分解酵素やトランスポーター、代謝酵素をコードする遺伝子群をもっているため、それらを効率よく資化し、増殖することができる。さらに、母乳オリゴ糖資化酵素は乳児に生息するビフィズス菌にのみ存在し、他の腸内細菌には殆ど存在しない。これらの理由から、ビフィズス菌は乳児大腸に届く母乳オリゴ糖を独占的に資化し、最優占種となることが可能であると考えられた。

申請者はこれまで、ビフィズスフローラ形成メカニズムへの理解をさらに深めるため、ビフィズスフローラのなかでも特定の種や遺伝子型の株が果たす役割に着目してきた。そして、母乳オリゴ糖のコア構造であるラクト-N-テトラオースに作用する酵素ラクト-N-ピオシダーゼ (LnbX) をもつ *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* (*B. longum*) や、多数の菌体外母乳オリゴ糖分解酵素を持つ *B. bifidum* が、菌体外で母乳オリゴ糖を分解し、分解物を他のビフィズス菌種に分け与えることで、ビフィズスフローラ全体に影響を及ぼす重要な種であることを見出した (Yamada C and Gotoh A *et al.*, 2017, Cell Chem. Biol., and Gotoh A *et al.*, 2018, Sci. Rep.)。

(3) 母乳脂質を介したビフィズスフローラの意義の可能性

一方、「なぜ」ヒトが乳児期の最優占種としてビフィズス菌を選択したのかについては不明である。前述したとおり、母親が多大なエネルギーを消費して乳児の栄養とはならない母乳オリゴ糖を合成し、ビフィズスフローラを形成させるという事実は、そこに非常に大きなメリットが存在することを示している。実際に、乳児期の腸内細菌叢状態が、栄養、免疫、神経組織発達などに関係し、その影響がその後も長期的に続くことを示唆する報告は多数存在しているが (Cox L *et al.*, 2014, Cell)、それを分子レベル、遺伝子レベルで解明した例は少ない。そこで申請者が本研究で取り組むのは、ビフィズスフローラのメリットのひとつとしての「ビフィズス菌による母乳脂質の変換」である。

母乳中の脂質の主な役割は宿主のエネルギー源としてであり、乳児体内にも吸収されるが一部は腸に届く。総母乳脂質の98%がトリアシルグリセロールで、さらに脂肪酸組成としてはオレイン酸(OA)、パルミチン酸、リノール酸(LA)、ステアリン酸などが多く含まれる。母乳中には胆汁刺激性リパーゼが含まれており、消化管内でトリアシルグリセロールからこれら脂肪酸を遊離すると考えられている。

2015年に、LAの水和反応で生じる10-ヒドロキシ-*cis*-12-オクタデセン酸(HYA)について、腸管バリア機能を高める機能があることが明らかにされた (Miyamoto J, *et al.*, 2015, JBC)。具体的には、潰瘍性大腸炎モデルマウスの大腸における炎症応答がHYA経口投与により軽減されること、またヒト腸管上皮細胞Caco-2のタイトジャンクションがHYA添加によって強化されることが報告されている。申請者は、母乳中に含まれるLAについても、HYAに変換される可能性があると考え、母子1組由来の母乳と乳児糞便サンプルより抽出した脂質画分をGC/MSにより分析したところ、糞便由来脂質画分でのみHYAが検出されることを見出した。

LAが水和されHYAが生じる反応は、乳酸菌で報告されているLAをOAにまで変換する経路の初期段階として存在する (Kishino S *et al.*, 2013, PNAS)。ビフィズス菌もそ

の水和酵素をコードする遺伝子のホモログ遺伝子を有していたため、乳児糞便中で検出されたHYAが、ビフィズス菌によって産生された可能性があると考えた。ここで重要なのは、乳酸菌はLAをOAにまで飽和化してしまうが、ビフィズス菌は水和酵素のみしか有していないためにHYA以降の反応が起きないことすなわち蓄積する可能性が高いことである。そこで、主要な乳児型ビフィズス菌である*B. longum* および *B. breve* によるHYA産生の可能性を検討した。ビフィズス菌培養液にLAを添加し、嫌気環境下でインキュベートした後、培養上清より脂質を抽出、GC/MSによる分析を行ったところ、LAが減少し、HYAが検出されたことから、ビフィズス菌がLA→HYA変換活性を持つことが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、母乳オリゴ糖で増殖したビフィズス菌が、さらに母乳脂質を利用して有用機能性物質であるHYAを産生する可能性について検討する。ビフィズスフローラの意義については、これまでも免疫調節や短鎖脂肪酸の産生といった面から説明されてきたが、母乳脂質に注目した研究は全く新しいものである。

母乳脂質変換がビフィズス菌自身にとってメリットとなっている可能性もあるが、そうではなかった場合、ヒトとビフィズス菌間で物質やメリットのやり取りが互いに繰り返される、まさに共進化を強く示す結果である。また、より母乳に近い人工乳の開発や、菌製剤を含む医薬品・健康補助食品の開発への応用も期待される。

3. 研究の方法

(1) 乳児腸管内におけるHYA産生とビフィズス菌の関連

これまでの予備実験により、乳児糞便から抽出した脂質画分において、HYAが検出されることが既に見出されている。この乳児腸管内HYAの存在の一般性を確かめるため、複数の母子ペアから母乳及び乳児糞便を回収する。両サンプルより脂質抽出を行い、GC/MSによりLAおよびHYAを検出する。その結果をもとに、元の母乳に含まれるLAからHYAへの変換効率を算出する。同時に、乳児糞便サンプルからは腸内細菌ゲノムDNAを抽出し、16Sメタゲノム解析から割り出される菌数と、HYA変換効率の相関を解析することで、HYA産生とビフィズス菌との関連を検討する。

(2) ビフィズス菌水和酵素によるHYA産生の検討

LA→HYA変換活性をすでに確認した*B. longum* および *B. breve* 株について、水和酵素の候補遺伝子をクローニングし、大腸菌発現系より精製する。*in vitro* で本変換反応が起こるかを検討し、菌レベルでみられた活性が候補遺伝子由来酵素によるものであるかを確認する。水和酵素が確定された場合、ビフィズス菌による変換反応が促される環境の探索、すなわち水和酵素発現が誘導される条件を検討する。

(3) ビフィズス菌によるHYA産生誘導条件と意義

ビフィズス菌が、LA→HYA変換酵素を保存している(と同時にそれ以降の変換酵素は保持されていない)のは、本反応がビフィズス菌自体にとっても必要である可能性、あるいはヒトとの共生の中で獲得された可能性が考えられ、ヒトとビフィズス菌の共進化を理解するうえで興味深い。まず、前述した研究計画で用いる*B. longum* および *B. breve* 株について、LAや他の母乳中の脂肪酸を添加した場合、および母乳や人工乳を培地とした場合に、水和酵素の発現レベル変化をRT-PCRにより測定する。同時に、LAおよびHYAの有無がビフィズス菌自体に及ぼす影響についても注目する。さらに、他の乳児型ビフィズス菌と成人型ビフィズス菌、ヒト以外のビフィズス菌種・株間での違いがあるかを検討することで、上記した共進化の一端を理解することにつながると考えられる。

4. 研究成果

助産院において、母親と乳児のペアより、母乳および乳児糞便サンプルを回収した。両サンプルより脂質画分を抽出し、GC-MSにより脂肪酸(特にLA、OA、HYA、HYBについて)分析を行った。大部分のペアにおいて、HYAは母乳サンプルでは検出されず、糞便サンプルでのみ検出された。また、糞便サンプルからはゲノムDNAを抽出し、16S rDNAに基づくNGSにより、腸内細菌叢解析を行った。これらの結果を合わせ、LA

HYA 変換効率と、菌属および種レベルの細胞数との相関を網羅的に調べたところ、ビフィズス菌属と複数のビフィズス菌種が、HYA 変換効率と正に相関することが明らかとなった。このことから、乳児腸管内で起こる LA HYA 変換反応に、ビフィズス菌が関与することが示唆された。

それを確かめるため、*in vitro* での変換反応試験を行ったところ、乳児腸管内で豊富な *B. longum* と *B. breve* 菌体レベル、変換反応を担うと予測される酵素を大腸菌発現系で組換え酵素として発現・精製したもの、いずれにおいても LA から HYA を産生することが示された。さらに、ゲノム編集が可能な株を用いて遺伝子欠損株を作成、同様に評価したところ、同様に HYA の産生がみられたことから、ビフィズス菌自身が HYA 変換酵素を有することが確かめられた。

ここで実施した乳児糞便腸内細菌叢解析結果について、ビフィズス菌属に分類される OTU 配列を改めて BLAST 検索することにより、ビフィズス菌種をより詳細に確認したところ、10 種（亜種）が含まれ得ることが分かった。このうち、ゲノム配列情報が明らかとなっており、種（亜種）名が同定される 8 種について、変換酵素をコードする遺伝子を検索すると、大部分の株が該当遺伝子を保有していた。続いて、菌株分譲機関より入手可能な株を用い、実際に菌体レベルで変換能を検討したところ、いずれの菌株でも HYA 産生が見られたが、その一方、変換能は大きく異なることが分かった。特に、乳児腸管内で多い種に関しては変換能が高い傾向が見られたことは、大変興味深い点であった。

また、乳児腸管内で豊富な *B. longum* と *B. breve* については、経時的な変換反応進行についても検討した。その結果、変換反応は、ある一定の変換効率（脂肪酸組成の比）に収束・飽和する傾向がみられた。これは、乳児糞便中においても変換が完全に起こらずに LA が残存した状態であったことと一致する。

以上の結果は、乳児腸管内ビフィズス菌が、母乳脂質由来の LA を、腸管バリア機能を向上させる HYA に変換することを明らかにした。これは、ヒトが母乳オリゴ糖によって特異的にビフィズス菌を増殖させ、ビフィズスフローラを形成する意義、すなわちヒトとビフィズス菌の「共進化」を説明する重要な知見である。

（本研究成果は論文発表準備中である。）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 M. N. Ojima, A. Gotoh, H. Takada, T. Odamaki, J. Xiao, T. Katoh, T. Katayama	4. 巻 18;11
2. 論文標題 Bifidobacterium bifidum Suppresses Gut Inflammation Caused by Repeated Antibiotic Disturbance Without Recovering Gut Microbiome Diversity in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Microbiol .	6. 最初と最後の頁 1349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.01349.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. J. Pichler, C. Yamada, B. Shuoker, C. Alvarez-Silva, A. Gotoh, M. L. Leth, E. Schoof, T. Katoh, M. Sakanaka, T. Katayama, C. Jin, N. G. Karlsson, M. Arumugam, S. Fushinobu, Maher A. Hachem	4. 巻 3;11(1)
2. 論文標題 Butyrate producing colonic Clostridiales metabolise human milk oligosaccharides and cross feed on mucin via conserved pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 3285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-17075-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakanaka M, Hansen ME, Gotoh A, Katoh T, Yoshida K, Odamaki T, Yachi H, Sugiyama Y, Kurihara S, Hirose J, Urashima T, Xiao JZ, Kitaoka M, Fukiya S, Yokota A, Lo Leggio L, Abou Hachem M, and Katayama T	4. 巻 28;5
2. 論文標題 Evolutionary adaptation in fucosyllactose uptake systems supports bifidobacteria-infant symbiosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 eaaw7696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aaw7696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakanaka M, Gotoh A, Yoshida K, Odamaki T, Koguchi H, Xiao JZ, Kitaoka M, and Katayama T	4. 巻 26;12
2. 論文標題 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.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12010071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato T, Ojima MN, Sakanaka M, Ashida H, Gotoh A, and Katayama T	4. 巻 8
2. 論文標題 Bifidobacterium bifidum to Host Glycans, Viewed from Glycoside Hydrolyases and Carbohydrate-Binding Modules.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8040481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ojima MN, Asao Y, Nakajima A, Kato T, Kitaoka M, Gotoh A, Hirose H, Urashima T, Fukiya S, Yokota A, Abou Hachem, Sakanaka M, and Katayama T	4. 巻 88
2. 論文標題 Diversification of a fucosyllactose transporter within the genus Bifidobacterium.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01437-21.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirano R, Sakanaka M, Yoshimi K, Sugimoto N, Eguchi S, Yamauchi Y, Nara M, Maeda S, Ami Y, Gotoh A, Katayama T, Iida N, Kato T, Ohno H, Fukiya S, Yokota A, Nishimoto M, Kitaoka M, Nakai H, Kurihara S	4. 巻 13
2. 論文標題 Next-generation prebiotic promotes selective growth of bifidobacteria, suppressing Clostridioides difficile.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gut Microbes	6. 最初と最後の頁 1973835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19490976.2021.1973835.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 後藤 愛那、橋本 豊之、米田 恭子、藤山 陽一、小関 英一、加藤 紀彦、田川 陽一、金 倫基、長谷 耕二、片山 高嶺
2. 発表標題 嫌気性腸内細菌と腸上皮細胞の共培養を可能とするフロー型アピカル嫌気培養器の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katoh T, Gotoh A, Norioka T, Kitaoka M, and Katayama T
2. 発表標題 Enzymatic synthesis of lacto-N-tetraose, a core structure of human milk oligosaccharide, using mutant phosphorylase.
3. 学会等名 The 1st Japan-Switzerland-Germany workshop for enzyme technology and bioprocess development. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ojima MN, Gotoh A, Takada H, Katoh T, and Katayama T
2. 発表標題 Probiotic Bifidobacterium bifidum Alters the Gut Microbiome after Repeated Antibiotic Disturbance but Contributes to the Recovery of Host Health.
3. 学会等名 ASM Microbe. (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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