

令和 3 年 4 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22277

研究課題名（和文）乳児腸管におけるビフィズスフローラ形成の生理的意義を探る

研究課題名（英文）Physiological role of bifidus flora formation in breast-fed 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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：乳児腸管におけるビフィズスフローラ形成機構を、ビフィズス菌の母乳オリゴ糖資化酵素を解析することで明らかとした。また、母乳オリゴ糖利用能を有する乳児型ビフィズス菌が高い芳香族乳酸産生能、中でもインドール乳酸を著量産生することを見出した。インドール乳酸は、腸管バリアや腸管免疫に関与していることが知られている。また、酪酸産生能を有する一部のFirmicutes門細菌が植物オリゴ糖のみならず一部の母乳オリゴ糖資化能も有していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではまず、乳児腸管におけるビフィズスフローラ形成の分子メカニズムを解明した。次に、ビフィズスフローラ形成の意義の解明に取り組み、乳児型ビフィズス菌には高いインドール乳酸産生能があることを見出し、その遺伝子を同定すると共に酵素解析を行った。インドール乳酸は腸管バリアや免疫に重要な役割を果たすことが示されている。また、一部の酪酸産生細菌が植物オリゴ糖のみならず母乳オリゴ糖資化能を有していることを見出した。以上の成果は、乳児期の菌叢形成機序と意義を知る上で重要な成果であり、調整乳開発にも多大な貢献をした（母乳オリゴ糖の調製乳添加の科学的基盤となった）。

研究成果の概要（英文）：We elucidated the molecular mechanism underlying bifidobacteria-rich microbiota formation in breastfed infant gut by genetically and enzymatically analyzing bifidobacterial enzymes involved in human milk oligosaccharide assimilation. We also found that bifidobacteria secrete a large amount of aromatic lactic acids, especially indole lactic acid, in the medium. Indole lactic acid is known to play important roles in maintaining intestinal barrier function and immune homeostasis. In addition, we found that several species of butyric acid-producing Firmicutes can assimilate both plant-derived oligosaccharides and HMOs. The results might imply adaptive response of these species to infant diet in the weaning period.

研究分野：応用微生物学

キーワード：母乳 母乳オリゴ糖 インドール乳酸 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

母乳栄養児の腸管においてはビフィズス菌が優勢な腸内細菌叢(ビフィズスフローラ)が形成されることが100年以上前から知られていたが、最近までそのメカニズムは明らかとされていなかった。ここ10年程の間に、我々を含む様々なグループが、乳児糞便から単離されるビフィズス菌には人乳中に含まれるオリゴ糖成分(ヒト母乳オリゴ糖)の資化能があること、また、ヒト母乳オリゴ糖に作用する様々な酵素群が存在していることを明らかとし、それらの遺伝子・酵素群の構造機能解析が精力的に行われてきた。これらの結果から、おそらくヒトとビフィズス菌は母乳オリゴ糖を介して共生・共進化してきたと考えられていたが、実際に母乳オリゴ糖代謝関連遺伝子や酵素の *in vivo* における機能を詳細に検証した研究はなく、また、乳児におけるビフィズスフローラ形成にどのような生理的意義があるのかも不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究は、

- 1) 母乳栄養児の腸管におけるビフィズスフローラ形成機構の解明
- 2) 乳児腸管におけるビフィズスフローラ形成の意義の解明を目的として行った。
また、本研究過程において見出した
- 3) 酪酸産生 Firmicutes 門細菌が有する母乳オリゴ糖分解酵素の解析についても並行して研究を行った。

3. 研究の方法

1) 母乳栄養児の腸管におけるビフィズスフローラ形成機構の解明

・母乳オリゴ糖トランスポーター解析用のビフィズス菌宿主の構築

Bifidobacterium longum subsp. *longum* JCM 31944 が有する母乳オリゴ糖代謝系遺伝子であるラクト-N-ピオシダーゼ(*lmbX*)およびガラクト-N-ピオース/ラクト-N-ピオースIトランスポーター(*gltA*)の2重破壊株を作製した上で、母乳オリゴ糖に作用する細胞内局在型エキソグリコシダーゼ(1,2- α -L-フコシダーゼ・1,3/4- α -L-フコシダーゼ・ β -1,3-ガラクトシダーゼ・ β -1,4-ガラクトシダーゼ・ β -N-アセチルグルコサミンダーゼ・シアリダーゼ)遺伝子を連結したプラスミドを導入した。これにより、母乳オリゴ糖を細胞外で分解したり、取り込んだりすることは出来ないが、細胞内では母乳オリゴ糖を単糖まで分解することが可能な菌株を作製した(MS554)。本菌株は母乳オリゴ糖トランスポーター異種発現解析のための宿主として用いることが可能である。

・ヒトサンプル回収

32名の母子ペアから母乳および乳児糞便を、また20名の成人から糞便を回収した。全てのドナーは健康であり、少なくともサンプル提供前の1ヶ月間の抗生剤投与歴はなかった。なお、サンプル回収に関しては京都大学医の倫理審査委員会の承認を得ている(R0046:腸内細菌と宿主の共生を支える分子基盤の解明)。

・ヒトサンプル分析

母乳オリゴ糖は、2-アミノアントラニル酸で蛍光ラベルした後、HPLCで解析した(Asakuma et al. 286:34583-34592. 2011)。なお、その際、イソマルトペプタオースを内部標準として添加した。糞便は凍結乾燥後に使用した。DNA抽出の際はビーズを用いて粉砕したサンプルを用いた(Gotoh et al. Sci Rep 8:13958.2018)。

・データマイニング

データベース上のヒト糞便メタゲノムデータセット(Yatsunen et al. Nature 486:222. 2012)のうち、母乳栄養児および完全調製乳栄養児のリードを対象にマッピングを行った。

・フコシルラクトーストランスポーター基質結合タンパク質の解析

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* ATCC15697のlocus tag Blon_0343およびBlon_2202のシグナルペプチド領域を削除したペプチド領域をT7システムで発現させて精製した。リガンドとの結合は等温滴定型カロリメーターおよび表面プラズモン共鳴によって解析した。また、2'-フコシルラクトースおよび3'-フコシルラクトースそれぞれの複合体結晶を作製し、X線構造解析を行った。構造解析はコペンハーゲン大学において行われた。

2) 乳児腸管におけるビフィズスフローラ形成の意義の解明

・菌叢解析およびメタボローム解析

両解析は、共同研究先のデンマーク工科大において行われた。サンプルはSCOTIコホート(59名)およびSIGコホート(25名)から回収した。

・芳香族乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子破壊および相補

Bifidobacterium longum subsp. *longum* JCM 31944ゲノムのlocus tag BSL_0985を挿入変異(シングルクロスオーバー)によって破壊した。相補プラスミドはpBSF38を使用して作製した(Sakanaka et al. J. Biosci. Bioeng. 118:489-495. 2014)。

・芳香族乳酸デヒドロゲナーゼの発現および機能解析

Locus tag BSL_0985 を T7 システムを用いて大腸菌で発現させて精製した。その後、各種芳香族ピルピンを基質として反応を行い、酵素学的パラメーターを算出した。活性測定は NADH の消費もしくは HPLC で蛍光検出した。

3) 酪酸産生 Firmicutes 門細菌が有する母乳オリゴ糖分解酵素の解析

・酵素機能解析

Bifidobacterium longum subsp. *longum* JCM 1217 株由来の新規なアミノ酸配列を有するラクト-N-ピオシダーゼのホモログが酪酸産生菌である *Ruminococcus inulinivorans* ゲノムに存在していた。デンマーク工科大において精製された本酵素の特異性を解析した。解析は HPLC および MALDI-TOFMS において行った。

4. 研究成果

1) 母乳栄養児の腸管におけるピフィズスフローラ形成機構の解明

母乳オリゴ糖は様々なオリゴ糖の混合物であるが、多くの場合、H 抗原(Fu α 1-2Gal-OR)を非還元末端に有しており(分泌型個体)、2'-フコシルラクトース・ラクト-N-フコペンタオース I・ラクト-N-ジフコヘキサオース I で全体の 5 割近くを占める。*B. infantis* ATCC 15697 由来の ABC トランスポーター遺伝子群 Blon_0341-0343 および Blon_2202-2204 を MS554 株(方法にて記載)に導入した異種発現株を作製し、母乳オリゴ糖含有培地で培養したところ、Blon_0341-0343 を導入した組換え株では培地中から 2'-フコシルラクトースおよび 3'-フコシルラクトースが減少しており、Blon_2202-2204 を導入した株では 2'-フコシルラクトースおよび 3'-フコシルラクトースに加えてジフコシルラクトースおよびラクト-N-フコペンタオース I が減少していた。空ベクターを導入した株では全く減少が見られなかった。*B. infantis* において Blon_0341-0343 および Blon_2202 の 2 重欠損株を作製したところ、これらの母乳オリゴ糖の資化能が著しく減少していた。すなわち、これらのトランスポーターが、2'-フコシルラクトース・3'-フコシルラクトース・ジフコシルラクトース・ラクト-N-フコペンタオース I の取り込みに重要であることが明らかとなった。基質結合タンパク質を精製し、カロリーメーターおよび表面プラズモン共鳴を利用して結合を解析したところ、Blon_0343 では 2'-フコシルラクトースの結合のみが、Blon_2202 では 2'-フコシルラクトース・3'-フコシルラクトース・ジフコシルラクトースのみが結合を示した。このことは、生化学的解析だけでは ABC トランスポーターの特異性を判断できないことを示しており、非常に興味深い。広い特異性を有していた Blon_2202 の構造解析を行い、2'-フコシルラクトースおよび 3'-フコシルラクトースが結合した複合体構造をそれぞれ 1.3Å および 1.4Å の分解能で決定した。Blon_0343 および Blon_2202 のホモログは一部のピフィズス菌、特に乳児型ピフィズス菌にのみ存在しており、他の細菌には全く見られなかった。また、乳児型ピフィズス菌の中でも *B. infantis* には広く保存していたが、*B. longum* や *B. breve* ゲノムにおいては低い頻度(10%程度)でしか存在していなかった。この結果は、乳児型ピフィズス菌の母乳オリゴ糖資化性は株依存的であるという過去の報告と一致していた。

次に、母乳および乳児糞便サンプルを用いて上記トランスポーターの存在率、母乳オリゴ糖の消費、およびピフィズス菌の占有率を調べた。その結果、基質特異性の広い Blon_2202 の存在割合とピフィズス菌優先率が高い正相関を示すことが明らかとなった。Blon_0343 および Blon_2202 遺伝子が糞便に検出されなかったグループと検出されたグループに分けて、基質である母乳オリゴ糖の濃度を比較したところ、母親(乳中)においては母乳オリゴ糖濃度に差がないものの、糞便中においては、Blon_0343 および Blon_2202 遺伝子が検出されたグループにおいて有意に減少していた。以上のことは、これらのトランスポーターを有するピフィズス菌が、乳児腸内において母乳オリゴ糖を利用して増殖していることを強く示唆している。また、他グループによって登録されたメタゲノムデータセットを解析した場合においても、Blon_0343 および Blon_2202 遺伝子はピフィズス菌占有率と高い正相関を示した。興味深いことに、完全人工乳栄養児においては、Blon_0343 および Blon_2202 遺伝子は全く検出されない代わりに、ガラクトオリゴ糖(プレバイオティクスとして調製乳に添加されている場合が多い)トランスポーターとピフィズス菌占有率に高い正相関が見られた。母乳栄養児と人工乳栄養児を比較した場合、母乳オリゴ糖代謝に関わるほぼ全ての遺伝子において、その占有率に差があり、母乳栄養児においてピフィズス菌との有意な正相関が見られた。これらの成果は、母乳オリゴ糖によるピフィズス菌増殖促進効果を示した初めての例として高く評価された。

(発表論文)

1. 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. Evolutionary adaptation in fucosyllactose uptake systems supports bifidobacteria-infant symbiosis. *Science Advances* 5:eaaw7696 (2019).
2. Katoh T, Ojima MN, Sakanaka M, Ashida H, Gotoh A, and Katayama T. Enzymatic adaptation of *Bifidobacterium bifidum* to host glycans, viewed from glycoside hydrolyases and carbohydrate-binding modules. *Microorganisms* 8(4):481 (2020).
3. Sakanaka M, Gotoh A, Yoshida K, Odamaki T, Koguchi H, Xiao JZ, Kitaoka M, and Katayama T. 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):7 (2019)

2) 乳児腸管におけるビフィズスフローラ形成の意義の解明

乳児糞便の 16S メタゲノム解析およびメタボローム解析を行ったところ (デンマーク工科大が担当) 芳香族乳酸であるフェニル乳酸・4-ヒドロキシフェニル乳酸・インドール乳酸が、中でも特にインドール乳酸がビフィズス菌占有率と高い相関を示した。これらの芳香族乳酸は、芳香族アミノ酸代謝中間体である芳香族ピルビン酸から生じる。様々なビフィズス菌種を用いて芳香族乳酸の産生能を調査したところ、乳児型ビフィズス菌 (母乳オリゴ糖資化能を有する) に高い産生能が見られた。比較ゲノム解析を行ったところ、乳酸デヒドロゲナーゼとわずかに相同性を示す ORF (locus tag BSL_0985) がこれらの産生菌にのみ保存されていることが明らかとなった。そこで、本 ORF の遺伝子破壊株を作製したところ、乳酸の産生量には変化が見られないものの、芳香族乳酸産生能が消失していた。次に、T7 システムを用いて本酵素を発現・精製し、酵素化学的諸性質を決定した。その結果、芳香族ピルビン酸のうち特にインドールピルビン酸に高い親和性を有すること、また、リン酸をヘテロトロピック因子とする *K*-type アロステリック酵素であることが明らかとなった。以上のことから、BSL_0985 を芳香族乳酸デヒドロゲナーゼと命名した。トリプトファンはヒトの必須アミノ酸として人乳中に含まれており、ビフィズス菌ゲノムにも完全な生合成経路が見られない。母乳オリゴ糖を資化して増殖したビフィズス菌は、トリプトファンを脱アミノ化した後に還元して芳香族乳酸を産生していると考えられ、ビフィズス菌とヒトの共生・共進化を担う分子の一つであると強く推察される。

発表論文 (公開済・審査中)

4. Laursen MF, Sakanaka M, von Burg N, Mörbe U, Andersen D, Moll JM, Pekmez CT, Rivollier A, Michaelsen KM, Mølgaard C, Lind MV, Dragsted LO, Katayama T, Frandsen HL, Vinggaard AM, Bahl MI, Brix S, Agace W, Licht TR, Roager HM.

Breastmilk-promoted bifidobacteria produce aromatic amino acids in the infant gut.

BioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.22.914994>

3) 酪酸産生 Firmicutes 門細菌が有する母乳オリゴ糖分解酵素の解析

本研究過程において、*B. longum* JCM1217 が有する母乳オリゴ糖分解酵素ラクト-*N*-ピオシダーゼのホモログが、ビフィズス菌以外の一部の腸内細菌に、中でも酪酸産生能があるとされる *Roseburia* 属細菌や *Eubacterium* 属細菌に存在していることが明らかとなった。*Roseburia inulinivorans* のホモログを精製し (デンマーク工科大が担当) 母乳オリゴ糖混合物に作用させて HPLC で解析したところ、通常のラクト-*N*-ピオシダーゼとは全く異なる特異性を有していることが明らかとなった。すなわち、ラクト-*N*-テトラオースには殆ど作用せず、フコース分岐 (Fuca1-4GlcNAc) のあるラクト-*N*-フコペンタオース II やラクト-*N*-ジフコヘキサオース I を良い基質としていた。*Roseburia homonis* のラクト-*N*-ピオシダーゼホモログはラクト-*N*-テトラオースを良い基質としていた。*R. inulinivorans* は、キシロオリゴ糖など一部の植物由来糖質も利用することが知られており、これらの菌が母乳オリゴ糖にも作用する酵素群を備えていることは、離乳期に見られる糞便中酪酸濃度の増加を考える上で非常に興味深い。

(発表論文)

5. Pichler MJ, Yamada C, Shuoker B, Alvarez-Silva C, Gotoh A, Leth ML, Schoof E, Katoh T, Sakanaka M, Katayama T, Jin C, Karlsson NG, Arumugam M, Fushinobu S, and Hachem MA.

Butyrate producing colonic Clostridiales metabolise human milk oligosaccharides and cross feed on mucin via conserved pathways.

Nature Communications 11(1):3285 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sakanaka Mikiyasu, Gotoh Aina, Yoshida Keisuke, Odamaki Toshitaka, Koguchi Hiroka, Xiao Jin-zhong, Kitaoka Motomitsu, Katayama Takane	4. 巻 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 71
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakanaka Mikiyasu, Hansen Morten Ejby, Gotoh Aina, Katoh Toshihiko, Yoshida Keisuke, Odamaki Toshitaka, Yachi Hiroyuki, Sugiyama Yuta, Kurihara Shin, Hirose Junko, Urashima Tadasu, Xiao Jin-zhong, Kitaoka Motomitsu, Fukiya Satoru, Yokota Atsushi, Lo Leggio Leila, Abou Hachem Maher, Katayama Takane	4. 巻 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 Science Advances	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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Pichler Michael Jakob, Yamada Chihaya, Shuoker Bashar, Alvarez-Silva Camila, Gotoh Aina, Leth Maria Louise, Schoof Erwin, Katoh Toshihiko, Sakanaka Mikiyasu, Katayama Takane, Jin Chunsheng, Karlsson Niclas G., Arumugam Manimozhiyan, Fushinobu Shinya, Abou Hachem Maher	4. 巻 11
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 Nature Communications	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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Katoh Toshihiko, Ojima Miriam N., Sakanaka Mikiyasu, Ashida Hisashi, Gotoh Aina, Katayama Takane	4. 巻 8
2. 論文標題 Enzymatic Adaptation of 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 481 ~ 481
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 片山高嶺
2. 発表標題 ビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖利用への適応進化
3. 学会等名 第13回多糖の未来フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山高嶺
2. 発表標題 ビフィズス菌とヒトの共生・共進化 分子機序と生理的意義の解明
3. 学会等名 2020年日本農芸化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takane Katayama
2. 発表標題 Symbiosis and co-evolution between bifidobacteria and humans, driven by human milk oligosaccharides
3. 学会等名 The 7th International conference on food factors（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山高嶺
2. 発表標題 ミクロロから見る乳児腸内菌叢の形成機構 - 母乳オリゴ糖とビフィズス菌 -
3. 学会等名 日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

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
研究分担者	加藤 紀彦 (Katoh Toshihiko) (40724612)	京都大学・生命科学研究科・助教 (14301)	

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
---------	---------