

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14770

研究課題名（和文）ヒト腸内における初期定着細菌のオリゴ糖利用メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying the utilisation of oligosaccharides by infant gut-associated bacteria

研究代表者

阪中 幹祥（Sakanaka, Mikiyasu）

京都大学・生命科学研究科・特定准教授

研究者番号：60801892

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト腸内において初期に定着する細菌であるビフィズス菌は、ヒトの健康に密接に関与している。これまでゲノム解析などによる様々な研究成果から、ビフィズス菌の腸内での増殖には本菌の多種多様なオリゴ糖利用が関与していることが強く示唆されている。本研究は、幅広い種類のオリゴ糖、特に母乳に含まれるオリゴ糖（母乳オリゴ糖）の利用機構をビフィズス菌において明らかにすることを目指し、その結果として、当該機構の一旦を解明することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの腸内に棲息するビフィズス菌は、ヒトの健康に有用な効果を発揮することが知られている。それ故、ビフィズス菌が如何にして腸内で増殖しているかを理解することは極めて重要といえる。このような状況の中、本研究にてビフィズス菌の腸内増殖機構（オリゴ糖利用機構）の一端を解明することが出来たことは、当該研究分野において大きな影響を及ぼすと考えられる。また将来的には、本研究成果を起点として、ビフィズス菌の腸内増殖を促進する技術が開発されることが大いに期待される。

研究成果の概要（英文）：Bifidobacteria, which colonise the human gut early in life, are closely associated with human health. Previous studies using genomic analyses have strongly suggested that bifidobacterial colonisation is mainly attributed to the ability of bifidobacteria to utilise a wide range of oligosaccharides. Here, we have partially elucidated the molecular mechanisms underlying the utilisation of different oligosaccharides, including milk oligosaccharides, by bifidobacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 ビフィズス菌 オリゴ糖 分子機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト腸内において初期(乳児期)に定着する細菌は、乳児期のみならず、その後のライフステージにおいてもヒトの健康に密接に関連していると考えられている。特に、初期定着細菌の代表種であるビフィズス菌は、宿主の健康増進・維持に寄与しているため、本菌が乳児期において如何にして腸内で増殖しているのかを明らかにすることは非常に重要といえる。次世代シーケンス解析の技術が確立されて以来、数々のビフィズス菌のゲノム配列が決定されており、その解析結果から、乳児腸内におけるビフィズス菌の効率的な増殖には多数のオリゴ糖利用関連酵素をコードする遺伝子が重要ということが分かり始めている。しかし、これらの遺伝子の機能は推定に留まっているものが多く(すなわち、当該遺伝子がオリゴ糖利用にどの程度寄与しているかについては不明な部分はまだ多く残されており)、ビフィズス菌のオリゴ糖利用機構の全容解明には程遠い。

2. 研究の目的

1で記載した通り、ビフィズス菌のオリゴ糖利用機構の全容は解明されていない。本研究では、数あるオリゴ糖の中でも特に母乳に豊富に含まれているオリゴ糖(以後、HMOs;百種類以上のオリゴ糖の総称)の利用機構をビフィズス菌において遺伝学的に解明することを目指した。さらに、HMOs 以外のいくつかのオリゴ糖についても焦点を当て、ビフィズス菌の様々なオリゴ糖利用機構を理解することとした。

3. 研究の方法

(1) ビフィズス菌の培養

ビフィズス菌の培養は嫌気条件下にて 37℃ で実施した。培地はシステインとアスコルビン酸を添加した MRS 培地 (MRS-CS 培地) を使用した。ビフィズス菌の糖利用能を調べる際には、MRS-CS 培地中に含まれているグルコースの代わりに別の糖を添加した。菌の生育は濁度 (OD₆₀₀) を測定することによりモニターした。

(2) HMO 分析

培養上清中の HMO 濃度の定量は、既報の通り、各 HMO 分子種をアントラニル酸で標識し、HPLC 分析に供することで実施した (Asakuma et al., 2011)。

(3) 遺伝子の保存性解析

遺伝子の保存性解析は、NCBI のゲノムデータベースを用いた tblastn 解析 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により実施した。

(4) 無細胞抽出液を用いた酵素反応

HMOs の一種である 2'-フコシルラクトースを唯一の炭素源として添加した MRS-CS 培地にてビフィズス菌を培養した。その後、菌体を超音波破砕に供し、無細胞抽出液を取得した。無細胞抽出液は、様々なフコシル化 HMO 分子種とインキュベートさせ、各々の HMO 分子種が分解されるかを薄層クロマトグラフ法により調べた。

(5) ビフィズス菌の遺伝子欠失

ビフィズス菌の遺伝子欠失は、プラスミドを介した二重相同組換え法により実施した。相同組換えのために、標的遺伝子の上流と下流の配列を相同領域として用いた。

4. 研究成果

(1) *Bifidobacterium catenulatum* subsp. *kashiwanohense* のフコシル化 HMO 利用機構の解明

本研究では、ヒト乳児腸内においてしばしば検出されるビフィズス菌種 *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* を対象として、フコシル化 HMOs (フコースが付加された HMOs; 主要な HMO 分子種) の利用機構を解明することを目指した。その結果として、本菌が有するフコシルラクトース輸送体ホモログは、これまでに同定されていたビフィズス菌のフコシルラクトース輸送体よりも幅広い種類のフコシル化 HMO 分子種を取り込めることを見出し、*B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* の稀有な HMO 利用機構の一旦を解明することができた。

まず、*B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* を HMO 混合物を炭素源として培養し、培養上清を HMO 分析に供したところ、本菌は幅広い種類のフコシル化 HMO 分子種を消費することが明らかとなった。対照的に、*B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* の近縁種である *Bifidobacterium pseudocatenulatum* は、比較的限られたフコシル化 HMO 分子種しか消費できないことが同様の解析により示された。興味深いことに、これまで我々が同定したフコシルラクトース輸送体(以後、FL 輸送体-2; 限られたフコシル化 HMOs を取り込む; Sakanaka et al., 2019) のホモログは、両菌のゲノム上に保存されているものの、FL 輸送体-2 との配列一致性が *B.*

pseudocatenulatum では 90 %程度、*B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* では 70 %程度であった。このことから、*B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* が持つ FL 輸送体-2 ホモログはアミノ酸配列が変化することにより、認識可能なフコシル化 HMO 分子種を拡げている可能性が示唆された。

続いて、上記の仮説を検証するために、*B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* 由来の FL 輸送体-2 ホモログを、HMOs を取り込めないように改変した *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 株に導入し、当該組換え株を HMO 混合物存在下で培養した。その結果、空ベクターを導入した *B. longum* subsp. *longum* 株では、フコシル化 HMOs の消費が観察されなかったものの、FL 輸送体-2 ホモログを発現させた株では、*B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* と同様に、幅広い種類のフコシル化 HMO 分子種を消費できることが示された。さらに、*B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* において、FL 輸送体-2 ホモログの遺伝子をゲノム上から欠失させた場合においても、フコシル化 HMO 消費能の大幅な低下が観察された。これらのことから、*B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* が持つ FL 輸送体-2 ホモログは確かに幅広い種類のフコシル化 HMO 分子種を取り込めることが実証された。

さらに、菌体内に取り込まれた後のフコシル HMOs の分解機構についても理解を得るために、ピフィズス菌の無細胞抽出液を様々なフコシル化 HMO 分子種と共にインキュベートし、当該分子種が分解されるかを薄層クロマトグラフ法により検証した。その結果、二つの細胞内フコシダーゼ *AfcA* と *AfcB* を持つ *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* の無細胞抽出液は、供試した全てのフコシル化 HMO 分子種を分解するのに対して、*AfcA* しか保持しない *B. pseudocatenulatum* (基質特異性が限られている FL 輸送体-2 ホモログを持つ) は、一部のフコシル化 HMO 分子種しか分解できなかった。興味深いことに、NCBI データベースにて公開されている様々なピフィズス菌株のゲノム配列を調べてみると、基質特異性が幅広い FL 輸送体-2 ホモログを持つピフィズス菌株は *AfcA* と *AfcB* の両方を保持しているのに対して、基質特異性が限られている FL 輸送体-2 ホモログを持つピフィズス菌株は *AfcA* しか基本的には持っていなかった(例外として、ほぼ全ての種類の HMO 分子種を利用できる *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* は、基質特異性が限られている FL 輸送体-2 ホモログを持つものの、他にも様々な HMO 輸送体を有しているため、*AfcA* のみならず *AfcB* も保持していた)。

以上のことから、*B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* は、フコシルラクトース輸送体が認識可能な基質を拡げると共に細胞内フコシダーゼ *AfcB* を獲得することで、幅広い種類のフコシル化 HMO 分子種に適応できるようになったと予想される。

(2)(1) 以外のオリゴ糖利用戦略の理解

ピフィズス菌の様々なオリゴ糖利用機構を理解することを目指して、他のオリゴ糖利用関連遺伝子にも焦点を当て機能解析を行った。*Bifidobacterium breve* のラフィノース輸送体遺伝子および *B. longum* subsp. *longum* のラクツロース輸送体遺伝子に対して欠失変異を導入した。その結果、前者のラフィノース輸送体欠失株は野生株と比較してラフィノース存在下で生育が大幅に低下することが明らかとなった。後者のラクツロース輸送体欠失株は、野生株と比べて生育が遅延することが示された。これらの結果は、過去の挿入変異導入による遺伝子欠損株の性状解析の結果 (O'Connell et al., 2013; Yoshida et al., 2021) と概ね一致していた。今回、挿入変異導入ではなく、欠失変異導入を応用したことにより、ピフィズス菌の遺伝子の機能をより正確に評価することができたと考えられる。

以上を通して、本研究は、初期定着細菌であるピフィズス菌のオリゴ糖利用機構、特に HMOs の利用機構に関する研究の進展に大きく貢献したと考えられる。今回明らかにしたピフィズス菌のオリゴ糖利用機構に基づいて、今後、ピフィズス菌の新たな腸内増殖技術が開発されることが期待される。

< 引用文献 >

Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, Yoshida E, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H, Ashida H, Hirose J, Kitaoka M. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *J Biol Chem*, 2011, 286:34583-34592.

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, Katayama T. Evolutionary adaptation in fucosyllactose uptake systems supports bifidobacteria-infant symbiosis. *Sci Adv*, 2019, 5:eaaw7696.

Yoshida K, Hirano R, Sakai Y, Choi M, Sakanaka M, Kurihara S, Iino H, Xiao JZ, Katayama T, Odamaki T. *Bifidobacterium* response to lactulose ingestion in the gut relies on a solute-binding protein-dependent ABC transporter. *Commun Biol*, 2021, 4:541.

O'Connell KJ, O'Connell Motherway M, O'Callaghan J, Fitzgerald GF, Ross RP, Ventura M, Stanton C, van Sinderen D. Metabolism of four -glycosidic linkage-containing

oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79:6280-92.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakanaka Mikiyasu	4. 巻 25
2. 論文標題 Diverse strategies for utilizing fucosylated human milk oligosaccharides found in bifidobacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoforum	6. 最初と最後の頁 A1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32285/glycoforum.25A1	査読の有無 無
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 Ojima Miriam N., Asao Yuya, Nakajima Aruto, Katoh Toshihiko, Kitaoka Motomitsu, Gotoh Aina, Hirose Junko, Urashima Tadasu, Fukiya Satoru, Yokota Atsushi, Abou Hachem Maher, Sakanaka Mikiyasu, Katayama Takane	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 e0143721
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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阪中幹祥
2. 発表標題 母乳オリゴ糖利用戦略から見てきたビフィズス菌と宿主の共進化の軌跡
3. 学会等名 酪農科学シンポジウム2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阪中幹祥
2. 発表標題 ヒト乳児腸内に棲息するビフィズス菌の生理学的役割：母乳成分の代謝から分かってきたこと
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022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			
デンマーク	デンマーク工科大学			