NUMBER 33

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

RESEARCH COMMUNICATIONS

2019

公益財団法人 発酵研究所

No. 33



$2 \ 0 \ 1 \ 9$

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA (IFO)

Published by INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA 17–85, JUSO–HONMACHI 2–CHOME YODOGAWA–KU, OSAKA 532–8686, JAPAN

公益財団法人発酵研究所

理事長	中濱	一雄		
常務理事	樽井	直樹		
理 事	熊 清 富 原	英彦 昌 房男 俊	左子 鈴木 永井 古川	芳彦 健一朗 和夫 謙介
監事	下元	高文	藤井	智幸
評 議 員	大島 笹川 賀 石 藤 田	 敏久 千尋 室治 吉樹 正憲 	北下武土吉	勝 親 直 英 敏 臣

卷頭言	英彦	1
第13回助成研究報告会の開催横田	明	3
■ 平成29年度大型研究助成		
糸状菌-内生細菌の微生物間相互作用現象の解明西澤	智康	7
超高発酵菌体外多糖産生,新規乳酸菌の探索と 次世代シンバイオティック機能性評価	郁夫	23
魚類体表微生物叢の網羅的解析と感染予防効果の検討: 抗生物質を代替する養殖魚類表皮版プロバイオティクスの		
確立を目指して	克敏	31
酸素発生型光合成により駆動する嫌気発酵プロセス得平	茂樹	47

目 次

■ 平成25年度寄付講座助成

腸内シンビオシスの分子機序解明とその高度応用展開	系 新	57
Gifu 嫌気性培地を用いたヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種の培養 および短鎖脂肪酸発酵特性に基づくその評価 後藤 愛那,阪中 幹祥,片山 高嶺,栗	栗原 新	61
ヒト腸内常在菌叢最優勢種におけるポリアミン輸送および生合成の 包括的分析:新規ポリアミン代謝および輸送遺伝子の存在の可能性 杉山 友太,阪中 幹祥,栗	長原 新	79
中性の生育条件下で機能する 大腸菌の新規プトレッシンエクスポーター SapBCDF の同定 杉山 友太,阪中 幹祥,片山 高嶺,栗	丧原 新	91
Bacteroides 属細菌におけるポリアミン生合成系遺伝子の機能解析 阪中 幹祥, 片山 高嶺, 栗	長原 新	105
複数の腸内常在細菌の生存戦略が組み合わさることによって成立する 新規ハイブリッドシステムによる生理活性物質ポリアミンの生産栗原	系 新	113
β-ガラクト- <i>N</i> -ビオシド構造を有する globo H, Gb5, および GA 1 糖鎖に対する 2 種のラクト- <i>N</i> -ビオシダーゼの特異性 後藤 愛那, 栗原 新, 片山	山高嶺	131

高効率 1,2-α-L-fucosynthase の作出と
 様々な複合糖質へのH抗原構造の導入 …… 杉山 友太,片山 高嶺,栗原 新 139
 高効率 1,2-α-L-fucosynthase の応用展開 …… 杉山 友太,片山 高嶺,栗原 新 153
 Bifidobacterium bifidum によるヒト母乳オリゴ糖分解物の
 クロスフィーディングがビフィズスフローラ形成を促す
 …… 後藤 愛那,阪中 幹祥,栗原 新,片山 高嶺 161
 ビフィズス菌のフコシルラクトーストランスポーターに見られる
 適応進化が母乳栄養児腸管でのビフィズスフローラ形成に関与する

------阪中 幹祥, 栗原 新, 片山 高嶺 175

■ 平成29年度 一般研究助成

ナス科植物病原性アルタナリア属菌の分類および特性評価染谷 信室	孝 189
冬虫夏草がセミ共生真菌に進化した遺伝的基盤と生物機能の解明 - 寄生菌から共生菌への進化松浦 (憂 189
土壌環境をモデルにした培養基による難培養放線菌の分離法の開発と 微生物資源の獲得松本 厚手	子 190
菌根を分離源とした菌根性きのこの遺伝資源拡充: 分離源菌根の形態学的特徴の解明と分離手法の改良遠藤 直棒	尌 191
地下深部油ガス田におけるメタン生成機構の解明 - 共生培養法によるリグニン関連物質分解微生物の網羅的分離培養持丸 華-	子 191
日本産 Alternaria 属菌群および Cercospora 属菌群の分類学的研究中島 千時	晴 192
昭和期に記載された稀産シクエストレート菌の 実体解明と保全対策の再検討	道 193
雪氷環境における好冷性微細藻類の共生細菌 Hymenobacter nivis の ゲノム解析及び代謝機構の解明	更 193
河川水の自由生活性アメーバ内の非結核性抗酸菌を分離して 共生関係の実態を解明する西内由紀-	子 194
外来雑草エゾノギシギシを摂食するコガタルリハムシの腸内シュウ酸 分解細菌の共生機能の解明大坪和香-	子 195
酸化還元電位制御下でのコロニー形成「固相電気培養装置:SPECIES」 で拓く培養可能微生物圏のフロンティア木村善一	郎 196

藍建て発酵に関与するインジゴ還元酵素の		
機能と構造解析並びに染色への応用米田	一成	196
がん幹細胞選択的な細胞毒性を示す植物成分の微生物生産に向けた研究 關	光	197
高変異性好熱菌を利用した耐熱化変異酵素のハイスループット創出鈴木	宏和	198
クオラムセンシングフェロモンを介した腸内細菌とヒトのクロストーク岡田	正弘	198
基質多様性を有するアデニル化酵素の探索と D-アミノ酸ジペプチド生産法の開発	邦器	199
メディエータレス酵素機能電極用素子を志向した 直接電子移動型色素依存性脱水素酵素の探索と機能解析里村	武範	200
酵母におけるS-アデノシルメチオニンの生理機能に関する研究水沼	正樹	201
細菌の休眠および覚醒の制御機構の解明山口	良弘	201
腸内細菌によるビフィズス菌の Fim 線毛の ポリマー化誘導因子の探索とその機構解明西山	啓太	202
アルキルアルコールを配糖化する 微生物由来の新規配糖化酵素反応の開発上田	誠	203
「バイオ還元システム」利用拡大のための補酵素再生系 グルコース脱水素酵素の進化工学的改変」片岡	道彦	203
大腸菌エネルギー代謝における解糖系と好気 TCA 経路の使い分け・ 相互変換スイッチング機構の解明・・・・・田中	寛	204
微生物由来ピペリン代謝酵素に関する研究	達彦	205
PET 分解酵素の structure-based design による高機能化と応用に関する研究繊田	昌幸	206
藻類のミルキング培養法による省エネ型バイオ燃料生産プロセスの開発大田	昌樹	206
1,3-ジオール骨格化合物の発酵生産に向けたプラットフォーム経路の構築: 再生可能資源からのロケットプロペラント前駆体生産への挑戦	尚也	207
電気化学的制御によるセルロースナノファイバーの高効率合成椎木	弘	208
サンゴ共生藻における宿主非依存的な光合成産物の分泌に関わる 環境応答シグナル経路丸山耳	真一朗	208
嫌気環境での高効率キシロース発酵に向けた <i>Spathaspora</i> 属酵母のキシロース代謝遺伝子群の機能解析	佑	209

嫌気的環境汚染物質分解菌の遺伝子導入・破壊系の開発野尻	秀昭	210
嫌気性バルキング原因菌の微生物機能情報の解明と 高速メタン発酵リアクターのバルキングメカニズムの理解山田	剛史	211
鉄還元菌の多環芳香族炭化水素嫌気性分解代謝系の解明・・・・・・・・・・・・・・・・・・	謙吾	211
陸生カニ消化管より得られた微生物コンソーシアのセルロース・ リグニン分解機序の解明とメタン発酵前処理への応用	保徳	212

■ 平成28年度若手研究者助成

環境 DNA メタバーコーディングにより可視化された 祖先的な木材腐朽性きのこ類の多様性と見えない未知系統………………………白水 貴 215

■ 助成研究のその後

大腸菌表層ストレス応答: インプットとアウトプットに働くプロテアーゼの機能秋山	芳展	217
コロニー形成の遺伝学,その後正木	春彦	221
レアメタル気化微生物の分離・同定と機能解析(その2)山下	光雄	223

卷 頭 言

卷 頭 言

熊 谷 英 彦*

今から50年以上も前の話であるが、筆者が大学院生のころ、所属する京都大学の醗酵生 理及び醸造学研究室(故緒方浩一先生担当)では、微生物保存株の植え継ぎがほぼ毎年行わ れていた.酵母、カビ、バクテリア、それぞれ担当があったが、私は自分の研究との関係か らバクテリアを担当することが多かった.100株以上の手つかずのバクテリアの斜面培養か ら各3本の新しい斜面培地に、無菌箱の中でガスバーナーと白金耳を使いながら植え替えた. なぜか夏休みの暑い時が多く、汗をかきながら、綿栓の残り火の部分を手でこするので指先 を真っ黒にしながら続けた覚えがある.でも、しんどいとかイヤだとかという感じは全くな かった.若かったせいもあるが、その作業の大切さが分かっていたからだと思う.菌株をい ろいろ実際に触ってみると、菌株の顔(斜面培養上の集落の形状や色つや)が分かり、それ とラテン語の面白い属種名が結びついて、なんだか新しい世界が見えるように思った.それ とともに保存中にバクテリア集落の形状が変わることや、菌株が変異することも経験した.

私は微生物の酵素について研究してきたが,新しいテーマに入る時は必ずスクリーニング をした.目的とする酵素の活性が高い菌株を選ぶためである.その時に保存株が役に立ち, 保存株中にない場合は,保存機関からとり寄せた.ご指導いただいていた山田秀明先生は, 武田薬品工業㈱の研究所に電話して,IFOから必要な菌株を取り寄せられた.保存株のコン タミに際しても同様に取り寄せるということで,IFOは当時からずーっと頼もしい,ありが たい存在であった.

平成14年度をもって、IFOはその微生物の収集,保存,分譲業務をNITEバイオテクノ ロジーセンター(NBRC)に譲渡移管し,平成15年度からは,微生物研究者に対する研究 助成を行う大きな業務上の方向転換をした.このことは,私達大学の微生物研究者にとって は、IFOをより身近により頼もしくより有難い存在と感じさせるものであった.個人的には, 研究助成の審査や寄付講座の審査に関ることで勉強になったし、身近な後輩たちが助成や寄 付講座の対象となり,研究の新展開や発展の上で大きな助けになった.日本の微生物研究の 進展に直接広く大きな貢献をしていることは言うに及ばないが,特に,助成課題1「微生物 の分離,分類,保存に関する研究」を基本とし,重要視している点が特徴的であり,多くの 微生物学研究者が強く共感し高く評価しているところである.IFOの伝統を踏まえているこ とはもちろん,あらゆる微生物学において基本的に重要な分野でありながらどちらかといえ ば日の当たらない分野を重点対象としているからである.

この巻頭言を書くにあたり、IFO の歴史を IFO Research Communications で勉強した.設立当初から の社会情勢とあいまった関係者の方々のご苦労が読み取れ大変興味深く読んだ.ただ単に社会の変化に対 応するだけでなく、学問の進展を世界的な視野でとらえながら日本の微生物学発展に寄与する最適な現実 的な目標を持ち、業務の展開を図ってこられたことが読み取れる.このような社会情勢を踏まえた、現場 重視の地道な対処の仕方は、IFO の名称の中にある「大阪」の商法の歴史的伝統を踏まえたものではない かと感じる.本財団の成果発表会や懇親会に多くの人が集まり、「微生物をこよなく愛し、微生物を大切に すること」*1の精神が広く大きく育っていると強く感じる.

^{*1} 生物工学会誌93(3)139-148, 中浜一雄. 2015.「微生物株の保存とバックアップ~発酵研究所設立当時の理事会議事録から~」の 中から引用

第13回助成研究報告会の開催

令和元年6月7日(金)千里ライフサイエンスセンター山村雄一記念ライフホールにおいて, 第13回助成研究報告会を開催し,2年間の助成を受けた大型研究助成4件の研究成果の口頭 発表,5.5年間の助成を受けた寄付講座助成1件の研究成果の口頭発表,ならびに2年間の 助成を受けた一般研究助成34件と若手研究者助成1件の研究成果のポスターによる発表が 行われた.本報告会には大学,国公立研究機関,企業の研究者,大学院生を含めた254名が 参加しました.

中濱一雄理事長から開会の挨拶があり、樽井直樹常務理事の司会で報告会が進行した、大 型研究助成4件のうち、「糸状菌-内生細菌の微生物間相互作用現象の解明」(西澤智康)の 1題は左子芳彦 京都大学名誉教授の座長のもとに、「超高発酵菌体外多糖産生、新規乳酸菌 の探索と次世代シンバイオティック機能性評価」(木村郁夫)および「魚類体表微生物叢の 網羅的解析と感染予防効果の検討:抗生物質を代替する養殖魚類表皮版プロバイオティクス の確立を目指して」(堀 克敏)の2題は西山 真 東京大学生物生産工学研究センター教授の座 長のもとに、「酸素発生型光合成により駆動する嫌気発酵プロセス」(得平茂樹)の1題は福 田雅夫 中部大学応用生物学部教授の座長のもとに口頭発表が行われた. また寄付講座助成の 1題「腸内シンビオシスの分子機序解明とその高度応用展開」(栗原 新)は永井和夫 東京工 業大学名誉教授の座長のもとに口頭発表が行われた。各研究発表に対して活発な討議がなさ れ、示唆に富んだ意見も出されて実りのある発表会となった。発表会の最後に、本年3月で 設置期間が終了した石川県立大学腸内細菌共生機構学寄付講座の栗畑 新 准教授から謝辞が 述べられ、また本年度開設される京都大学寄付講座の吉見 明 准教授から紹介の挨拶があっ た。発表の内容は全文が本報告集に収録されている。寄付講座助成の報告は総論1報と各論 10報に分けて報告されている。なお、本報告集には過去に大型研究助成を受けた研究者のそ の後の研究経過についての報告も収載されています.

引き続いて一般研究助成34件および若手研究者助成1件はポスター展示による発表がな された.各ポスターの前で参加者と熱心な質疑が交わされた.さらにこの後行われた懇親会 の時間にもお酒を片手にポスターの前で討論する姿が見られて,ポスター発表内容について 十分に議論されたようであった.一般助成研究および若手研究者助成の研究結果は本報告集 ではページ数の関係で要約のみを掲載した.

懇親会には報告会参加者のほとんどが参加した.先ずは冨田房雄 理事(北海道大学名誉教 授)の挨拶があり,次いで鈴木健一朗 理事(東京農業大学教授)のご発声で乾杯を行った. 懇親会では,参加者の間で和やかに歓談が持たれたのに加えて,報告会では十分に出来なかっ た質疑応答も行われ,また異なる分野の研究者の間で賑やかな交換が見られた.今回の報告 会および懇親会にも若手の研究者が多数参加され,新旧の研究者の交流の場としても十分役 だったものと思われます.参加された皆様のご協力に心から感謝致します.

来年の第14回助成研究報告会は2020年6月5日(金)に同じ会場で開催致します. 以下に報告会,ポスター展示,懇親会の模様の一部を写真で紹介する.

(文) 横田 明



開会挨拶 中濱 一雄 理事長



座長 左子 芳彦 先生



座長 西山 真 先生



座長 福田 雅夫 先生



座長 永井 和夫 先生



西澤 智康 氏



木村 郁夫 氏



堀 克敏 氏



得平 茂樹 氏



栗原 新氏



司会 樽井 直樹 常務理事





講 演 会





ポスター発表



挨拶 冨田 房男 理事



乾杯 鈴木 健一朗 理事





懇 親 会



平成 21 年度以降の寄付講座教員と選考委員長(永井和夫先生,清水昌先生)

平成29年度大型研究助成の研究報告

助成期間:平成29年4月~平成31年3月

糸状菌-内生細菌の微生物間相互作用現象の解明

西澤智康

茨城大学農学部 〒300-393 茨城県稲敷郡阿見町中央3-21-1

Elucidation of Biological Interactions of Endohyphal Bacteria within Fungal Hyphae

Tomoyasu Nishizawa

Ibaraki University College of Agriculture 3-21-1 Chuou, Ami, Ibaraki 300-0393, Japan

Obligate bacterial endosymbionts are critical to the existence of many eukaryotes and are usually characterized by reduced genomes and metabolic dependence on the host, which can cause difficulties in isolating these endobacteria as pure cultures. Endofungal symbiotic bacteria are well characterized in the family Burkholderiaceae within the class Betaproteobacteria, and these frequently occur in the fungal phylum Mucoromycota. The genus Mortierella is one of the largest genera in the phylum Mucoromycota. In this study, we examined the presence/ absence of endofungal bacteria in diverse species of Mortierella. A total of 305 isolates of Mortierella spp. were surveyed, which were mainly obtained in Japan. As a result, Burkholderiaceae-related endobacteria (BRE) were found in 66 isolates of *Mortierella*, and the BREs in the *Glomeribacter-Mycoavidus* clade were separated phylogenetically into three groups. These groups consisted of a group containing *Mycoavidus cysteinexigens*, which is known to be associated with M. elongata, and two other newly distinguishable groups. These results demonstrated that BREs were harbored by many species of Mortierella, and those associated with isolates of Mortierella spp. were more phylogenetically diverse. In addition, a culturable endosymbiotic bacterium, Mycoavidus sp. strain B2-EB, present in the fungal host Mortierella parvispora E1425, was obtained successfully in this study, and its complete genomic sequence was newly determined. The results indicated genomic reduction occurring in the genome of strain B2-EB (chromosome size, 1.88 Mb), in comparison with those of other Burkholderiaceae-related endolyphal isolates (chromosome size, 2.76–2.80 Mb); was equivalent to that of the uncultured endosymbionts 'Ca. Glomeribacter gigasporarum' (draft genome sequence size, 1.62-1.73 Mb) harbored in the arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora margarita. This work allowed us to understand the genome evolution of the Burkholderiaceae-related endosymbionts. Phylogenetic analysis of concatenated housekeeping genes and calculation of the average nucleotide identity showed strain B2-EB was a new species affiliated with the genus Mycoavidus. Comparing with the massive expansions of transposable elements in other known Mycoavidus genomes (7.2-11.5% of total genome length), this proportion only accounted for 2.4% in the strain B2-EB genome. In addition, comparing with the genomes of the closest species, M. cysteinexigens, the strain B2-EB genome was characterized by the loss of genes involved in signal transduction, transcription, energy production, and conversion, as well as carbohydrate and amino acid metabolism. To the best of our knowledge, the strain B2-EB genome represents the smallest genome among cultured endofungal bacteria.

Key words: comparative genomics, endohyphal symbiont, isolation, Mortierella, Mycoavidus

E-mail: tomoyasu.nishizawa.agr@vc.ibaraki.ac.jp
 共同研究者: 郭永(茨城大学農学部)
 高島勇介(茨城大学農学部)
 成澤才彦(茨城大学農学部)
 太田寬行(茨城大学農学部)

緒 言

地球上の生物は共生や寄生など様々な相互関係を持っ ていることが知られている.環境中の微生物の複雑な生 態を考えてみると,微生物学の成立基盤において純粋培 養を確立することが重要であるため,環境微生物間でみ られる共生現象の理解が遅れたのではないだろうか(太田ら,2016). その典型的な例として,アーバスキュラー 菌根菌(AM菌)がもつ「細菌様構造体(Bacterium-like organelles(BLOs))」がある(Mosse, 1970). その報告 から30年以上が経ち,さらに2000年代のゲノム解読技 術の革新的進歩によって,ようやくこのBLOsの一つが 細菌として分類学的に位置づけられ,菌類内生細菌の研 究が始まった(Bianciotto *et al.*,2003).

微生物間で細胞内共生の関係があることが提起され, 糸状菌 – 内生細菌の関係では,アーバスキュラー菌根菌 Gigaspora margarita と そ の 内 生 細 菌 'Candidatus Glomeribacter gigasporarum' (Bianciotto et al., 2003), イネ苗立枯病の病原糸状菌 Rhizopus microsporus とリゾ キ シ ン 産 生 内 生 細 菌 Paraburkholderia rhizoxinica (Partida-Martinez & Hertweck, 2005; Partida-Martinez et al., 2007) で研究が進められてきた. 我々の先行研究に おいて,畑地土壌から分離した糸状菌 Mortierella elongata の複数株で Burkholderiaceae 科に属する内生細菌の 存在が明らかとなり,菌糸破砕物からグラム陰性菌のバ イオマーカーとなるエンドトキシンも検出され,菌糸内 部の BLOs は糸状菌に内生する Burkholderiaceae 科に属 するグラム陰性細菌であることが明らかとなった (Sato et al., 2010).

近年, 菌類に内生する細菌の探索が進み, 3門4亜門7 綱21目36科41属73種148系統の菌類に内生細菌が存在 することが確認され(高島ら, 2015), その内生細菌の16S rRNA 遺伝子配列の系統分類解析から5門(Proteobacteria, Bacteroidetes, Tenericutes, Firmicutes, Actinobacteria) と Cyanobacteria 門の糸状性 Nostoc punctiforme が内生す ることが報告された(太田ら, 2016). Betaproteobacteria 綱の Burkholderiaceae 科には、植物病原性 Rhizopus microsporus(Mucoromycotina 亜門)から純粋分離され た内生細菌で, Burkholderia 属の新種として記載された Paraburkholderia rhizoxinica & Paraburkholderia endofungorum (Partida-Martinez et al., 2007) や, 先に述べた M. elongata (Mortierellomycotina 亜門)から純粋分離され た内生細菌であり、同じく Burkholderiaceae 科の新属新 種として記載された Mycoavidus cysteinexigens が含まれ る (Ohshima et al., 2016). また, M. elongata 以外の Mortierella 属菌においても Mycoavidus 属細菌に属する と考えられる近縁種が内生していることが確認された (Takashima et al., 2018b). 未だ純粋分離には成功して いないが, Gigasporaceae 科に属するアーバスキュラー 菌根菌に内生する細菌も Burkholderiaceae 科に属し,新 属新種 'Candidatus Glomeribacter gigasporarum'として 提唱された(Bianciotto et al., 2003). 同様に, 分離培養 に至ったという報告はまだないが、Glomeromycota 門の3 目7科9属13種のAM 菌と,約9種のEndogone属糸状 菌からMolicutes綱の内生細菌が検出された(高島ら, 2015). M. elongataの内生細菌,菌根菌の内生細菌,そ してRhizopus属菌の内生細菌の3例は、いずれも隔壁 を持たない菌糸構造の糸状菌を宿主とし、 Burkholderiaceae 科に属するという共通点があった.

近年の網羅的ゲノム DNA 解読技術の進展は糸状菌 -内生細菌間の共生現象の解明に大きく貢献した. 内生細 菌のゲノム情報からその性質を推定することを目指し, 糸状菌から内生細菌画分を分取してゲノム解読した結 果,システイン生合成系と輸送系に関する遺伝子群を欠 いているという特徴を見出した(Fujimura et al., 2014). アメーバに共生する Legionella 属細菌はシステイン要求 性を示し、糖の利用性がないため(Feelev et al., 1979). システイン要求性を満たす専用の分離用培地(例えば BCYE a 寒天培地)が用いられている. そこで、分画し た内生細菌を BCYE α 寒天培地に接種したところ増殖が 認められ,新属新種の Mycoavidus cysteinexigens B1-EB^T 株の分離培養に成功した(Ohshima et al., 2016).純粋 分離に至っていない 'Ca. G. gigasporarum' も含めてゲノ ムサイズが判明している Burkholderiaceae 科の内生細菌 のなかで、そのゲノムサイズから判断すると、宿主糸状 菌の代謝に依存する生活様式が推察された.

本研究は、内生細菌を保有する M. elongata 以外の Mortierella 属糸状菌における内生細菌の分布とその多様 性を解析した. さらに、Mortierella 属に内生する Mycoavidus 属細菌を研究モデルとし、新たに分離培養 に成功した Mycoavidus 属の新種内生細菌のゲノム解読 と比較ゲノム解析から、糸状菌 – 内生細菌の共生関係、 特に共生微生物間の相互作用について報告する.

実験方法

サンプリング、サンプル調製および菌類の単離

動物遺骸,動物糞,植物組織,植物リター,キノコ(子 実体)および土壌を採集または分譲により入手した.土 壌からの Mortierella 属菌の分離は,主に湿室法により 行い,土壌上に発生した胞子嚢を_{LC}A培地(三浦・工藤, 1970)に移植することで菌株を確立した.また,それ 以外の基質については,表面洗浄,表面殺菌または未処 理のまま直接平板法を行い,生育してきた菌糸先端部ま たは胞子嚢を新しい_{LC}A培地に移植することで菌株を確 立した.分離菌株の培地上に細菌の増殖が確認された場 合は,van tighem法(Sato et al., 2010)により菌糸外に あるバクテリアを排除した.分離菌株は,_{LC}A培地上で 培養後,菌糸を含む寒天片ごと凍結保存液(10%グリセ ロール(v/v)および5%トレハロース2水和物(w/v)) 1mLに加え, -80℃のディープフリーザーで凍結保存した.また, NITE Biological Resource Center(NBRC) および CBS-KNAW culture collection (CBS) より *Mortierella* 属菌をそれぞれ 11 および 12 菌株を入手した.

内生細菌の単離

Mortierella parvispora E1425株を用いて、Ohshima *et al.* (2016)の方法に従って内生細菌の単離を行った. 滅菌セロファンを被せた1/2CMMY寒天培地 (Corn meal agar, 8.5g/L; Malt extract 10.0g/L; Yeast extract, 1.0g/L; Agar, 7.5g/L)の上に宿主糸状菌を接種し、 23℃で5日間培養した.培養後、菌糸体をACES緩衝液 (pH6.9)に回収し、菌糸体の破砕を行った.ホモジナ イザーペッスルで破砕した菌糸懸濁液を遠心分離によっ て菌糸残渣を除いた後、上清を孔径の異なる2種類のメ ンブレンフィルター (8.0 μ m 孔径および 3.0 μ m 孔径) で2段階のろ過を行い、内生細菌の粗分画液を得た.シ ステイン含有培地 (BCYE α 寒天培地)に1mLの分画 液を接種し、室温 30日間で静置培養を行った.さらに、 生育した細菌コロニーから画線培養を行い、シングルコ ロニーを得た.

内生細菌の顕微鏡観察

菌糸内生細菌の蛍光顕微鏡観察は,Live/Dead[™] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Life Technologies Japan Ltd.)を用いた.染色は,回収した菌糸に染色液 を直接滴下し,一定時間経過後に染色液をリンスした後, プレパラートを作成した.蛍光顕微鏡 (BX51,Olympus Corp.)下で菌糸内に緑色または赤色に染まった細胞を 観察した.

透過型電子顕微鏡観察(株式会社東海顕微鏡解析,名 古屋)は、急速凍結-凍結置換法で行った。グリセロー ル寒天培地上で7日間培養した菌糸体を二枚の銅ディス クとサンドイッチするように設置し、液体プロパン (-175℃)で急速に凍結した、凍結したサンプルは2% 四酸化オスミウム含有置換緩衝液(アセトン:蒸留水= 98:2)中で-80℃,48時間の置換固定を行い、さらに -20℃,14時間と4℃,2時間の固定処理を行った後、 プロピレンオキシドと100%エタノールを用いて脱水処 理し、スパー樹脂で試料を包埋した。その後、ウルトラ ミクロトームを用いて厚さ90nmの超薄切片を作製し、 酢酸ウラニル溶液とクエン酸鉛で電子染色し、透過型電 子顕微鏡(JEM-1400Plus, JEOL)で観察した。

DNA 抽出と PCR 法による糸状菌および内生細菌の遺伝 子バーコード領域の塩基配列決定

1/2CMMY培地上に敷いた滅菌セロファン上に供試菌

株を接種し、十分に菌糸が生育するまで室温(約23℃) で培養した、培養後の菌糸体をセロファン上から無菌的 に2.0mLネジロチューブ(WATSON) または1.5mL チューブ(WATSON)に移し、Prepman Ultra Sample Reagent (Applied Biosystems) を 100 µL 加えた. その後, オートクレーブ滅菌した金属クラッシャー (TAITEC) またはペッスルで 菌糸体を 破砕し. DRY BATH INCUBATOR (Fast Gene)を用いて100℃,10分間イ ンキュベートした. 20,400×g. 3分間(室温)遠心した 後,上清を新しい1.5mLチューブに移した.次にTE 緩 衝液 (pH8.0) を 100 µL 加えた後、フェノール: クロ ロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1, v/v/v) を加え、2分間ボルテックスした. 遠心 (20,400×g, 15min. 4℃) した後、上層(水層) 100 *u*Lを新しいエッ ペンドルフチューブに移し、これを DNA 粗抽出液とし た. その後, エタノール沈殿により精製し, TE 緩衝液 (pH8.0) を加えてペレットを溶解し, DNA 抽出液とし た. DNA 濃度は NanoDrop 分光 光度計(Nanodrop Technoglogies Inc.)を用いて計測した. 抽出した DNA を 鋳 型 に し て, ITS1F-ITS4, ITS5-ITS4, ま た は ITS5-LR5プライマーセットを用いて、糸状菌 ITS1-5.8S-ITS2を含む領域を PCR 増幅し、 PCR 産物を精製し た(Takashima et al., 2018b). 精製した PCR 断片は ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.) で塩基配列を決定した. 宿主糸状菌のPCR 増幅 に用いた DNA 抽出液を鋳型とし、細菌 16S rRNA 遺伝 子の増幅に用いたユニバーサルプライマーで PCR 増幅 を行った(Sato et al., 2010). 精製した PCR 増幅断片は ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて塩基配列を決定した.

遺伝子バーコード領域を用いた宿主糸状菌の種同定と内 生細菌の分子系統解析

宿主糸状菌の分子同定のために、来歴が明確なカル チャーコレクションまたはハーバリウムに保存されている Mortierellomycotina 亜門に属する菌類のITS1-5.8S-ITS2 遺伝子領域をNCBIより収集し、ITS1-5.8S-ITS2 遺伝子 配列データベースを構築した(Takashima *et al.*, 2018b). 構築したデータベースを用いて blastn による相同性検索 を行い、宿主糸状菌の分子同定を行った. Takashima *et al.* (2018a) に従い、MAFFT (ver. 7.212) でアライン メントし、Gblocks (ver. 0.91b) でアラインメントより 保存領域を抽出したのち、MEGA (ver. 6.06)(Kumar *et al.*, 2008) でモデル推定を行い、RAxML (ver. 8.212) を用いて ITS1-5.8S-ITS2 遺伝子に基づく宿主糸状菌の 最尤系統樹を作成し、相同性検索および系統解析の結果 を統合することで分子同定を行った. また、得られた内生細菌の16S rRNA遺伝子は、 MAFFT (ver. 7.212)でアラインメントして MEGA (ver. 6.06)でモデル推定を行い、RAxML (ver. 8.212)を用 いて最尤系統樹を作成した(Takashima *et al.*, 2018b).

完全ゲノム配列決定とゲノム解析

分離培養した内生細菌をBCYE a 寒天培地で7日間培 養し, 集菌後, リゾチームで溶菌し, フェノール法で全 ゲノム抽出を行った(Guo et al., 2018). 抽出したゲノ ム DNA は PacBio RS II と Illumina HiSeq2500 を用いて シーケンスした(株式会社ジーンベイ、横浜). PacBio RS II では 20-kb のライブラリを作製し, P6-C4 ケミカル を用いて1個のSMRT cell でシーケンスした. Illumina HiSeq2500 では Truseq DNA PCR-Free Kit で 101-base ラ イブラリを作成し、Paired-end シーケンスした.得られ た塩基配列はSPAdes (ver. 3.10.1) (Bankevich *et al.*, 2012) でハイブリッド・アセンブリし, Pilon (ver. 1.22) (Walker et al., 2014) で塩基補正を行い、マニュアルで 環状化して完全ゲノム配列を決定した. アノテーション lt, Dfast (Tanizawa et al., 2018), BLAST-KOALA (Kanehisa et al., 2016), NCBI-COG (Galperin et al., 2015) を用いて行った. 推定された CDS は Orthofinder (ver. 2.3.3) (Emms & Kelly, 2015) でオルソログ・グルー プを作成し、シングルコピーの CDS 数から割合を計算 した. また, Burkholderiaceae 科糸状菌内生細菌 (BRE) の比較ゲノム解析は、BLASTP相同性検索を行い、75% 以上のアライメント・カバレージで10⁻⁵以下の*e*-value となるアミノ酸配列をホモログ遺伝子とした (Guo et al... 2018). さらに, eggNOG (Huerta-Cepas et al., 2015) を用いて Burkholderiaceae 科の自由生活型細菌と内生細 菌ゲノムの機能遺伝子プロファイルを作成し、CheckM (Parks et al., 2015) を用いて細菌ゲノム間で共通する シングルコピー遺伝子の保有率からゲノム完成度(%) を求めた.

内生細菌のMLSA解析と全ゲノム相同性検索

内生細菌分離株の分子系統解析は、Sharmin et al. (2018)のMultilocus sequence analysis(MLSA)法に 従い、5個のハウスキーピング遺伝子(atpD,gyrB,lepA, recA, rpoB)の塩基配列を用いてMAFFT(ver. 7.222) でアライメントし、Kakusan(ver. 4)でモデル推定を 行い、RAxMLを用いて最尤系統樹を作成した.また、 種の同定のため、最も近縁のMycoavidus cysteinexigens B1-EB^T株と全ゲノム相同性検索を行い、Whole-genome Average Nucleotide Identity(ANI,%)を算出した(Richter et al., 2015).

結果および考察

Mortierella 属菌に内生する細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

分離した 305 菌株およびカルチャーコレクションより入手 した 23 菌株の計 328 菌株について, PCR 法により内生細 菌の有無を調査した結果, 66 菌株より Burkholderiaceae 科に属する内生細菌が検出された (Table 1). これら Mortierella 属菌 66 菌株は, 25 種に分子同定されたこと から (Table 1), Burkholderiaceae 科に属する内生細菌は, これまで内生細菌が確認されていた Mortierella 属菌 2 種 (M. elongata および M. minutissima) に加えて, 新 たに Mortierella 属菌 23 種が宿主糸状菌となることが確 認された.

計 66 菌株の宿主糸状菌から検出された内生細菌の 16S rRNA遺伝子に基づく分子系統解析の結果,検出さ れたすべての内生細菌は, *Glomeribacter-Mycoavidus ク* レードに位置し, *M. cysteinexigens* B1-EB^T株が属するサ ブクレード (MorBRE group A) に加えて,2つの異な るサブクレード (MorBRE group B および group C) を 形成することが明らかとなった (Fig.1).

以上の結果から,特定のグループの内生細菌がより広範囲に Mortierella 属糸状菌に内生することが示され, これらの内生細菌は他の Burkholderiaceae の菌種とは独立した系統にあることが明らかとなった.

単離した Mycoavidus 属内生細菌のゲノム解読

細菌 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析 (Fig.1)から, 本研究で新たに分離した糸状菌 *M. parvispora* E1425株 に内生する細菌が *M. cysteinexigens* B1-EB^T株に最も近縁 であることが示され、システイン要求性があることを推 察した.そこで、先に分離したときと同様にシステイン 含有培地 (BCYE a 寒天培地)を用いて *M. parvispora* E1425株に内生する細菌の分離培養を試みた.内生細菌 の分画液を BCYE a 寒天培地の上に接種し、室温で 30 日間の培養後にコロニーを形成し、さらにコロニーから 画線して7日間の培養を行い、シングルコロニーを得た. 細菌 16S rRNA 遺伝子領域の塩基配列が *M. parvispora* E1425株に内生する細菌と一致しことから、この内生細 菌分離株を B2-EB 株と名付けた.

先行研究の*M. cysteinexigens* B1-EB^T株の完全ゲノム解 読から、ゲノム上に可動遺伝因子領域が多く見出され、 多数の反復配列が含まれていた.そこで本研究では、ロ ングリード法の PacBio RS II およびショートリード法の Illumina HiSeq2500を用いて B2-EB 株ゲノムのシーケン スを行った. PacBio RS II から約 926 Mb 分のロングリー

糸状菌-内生細菌の微生物間相互作用現象の解明

Host fungal species*	Isolate no.	Culture collection no.	Isolation sources	Location	Detected MorBRE group
Mortierella elongata	YTM18	JCM 33085	Soil	Okinawajima- island, Okinawa	С
Mortierella elongata	YTM19	JCM 33086	Soil	Okinawajima- island, Okinawa	С
Mortierella sp. "zonata"	YTM23	JCM 33087	Plant	Miyakejima- island, Tokyo	В
Mortierella alpina	YTM25	JCM 33088	Plant	Miyakejima- island, Tokyo	В
Mortierella verticillata	YTM35	JCM 33089	Plant	Miyakejima- island, Tokyo	А
Mortierella humilis	YTM36	JCM 33090	Soil	Tochigi	А
Mortierella sugadairana	YTM39	JCM 33091, NBRC 112366	Plant	Hokkaido	С
Mortierella alpina	YTM40	JCM 33092	Fungi	Ibaraki	В
Mortierella sp. 6	YTM49	JCM 33093, NBRC 112368	Soil	Kanagawa	С
Mortierella sp. 6	YTM50	JCM 33094	Soil	Kanagawa	С
Mortierella sp. 5	YTM53	JCM 33095	Soil	Kanagawa	С
Mortierella horticola	YTM78	JCM 33096	Plant	Ibaraki	В
Mortierella sp. 4	YTM104	JCM 33097	Soil	Kumejima- island, Okinawa	С
<i>Mortierella</i> sp. 4	YTM108	JCM 33098	Soil	Kumejima- island, Okinawa	С
Mortierella sp. 15	YTM110	JCM 33099	Soil	Kumejima- island, Okinawa	А
Mortierella sp. 15	YTM112	JCM 33100	Soil	Kumejima- island, Okinawa	А
Mortierella sp. 15	YTM113	JCM 33101	Soil	Kumejima- island, Okinawa	А
Mortierella ambigua	YTM115	JCM 33102	Soil	Kumejima- island, Okinawa	В
Mortierella gamsii	YTM123	JCM 33103	Soil	Hokkaido	А
Mortierella gamsii	YTM124	JCM 33104	Soil	Hokkaido	А
Mortierella gamsii	YTM127	JCM 39001	Soil	Hokkaido	А
Mortierella gamsii	YTM131	JCM 39002	Soil	Hokkaido	С
Mortierella jenkinii	YTM133	JCM 39003	Soil	Hokkaido	С
Mortierella sp. 11	YTM134	JCM 39004	Soil	Hokkaido	С
"Mortierella oedorhiza" ª	YTM135	NBRC 112369	Soil	Hokkaido	С
Mortierella elongata	YTM138	JCM 39005	Soil	Hokkaido	С
Mortierella elongata	YTM139	JCM 39006	Soil	Hokkaido	С
Mortierella sp. "zonata"	YTM160	JCM 39007	Soil	Toyama	С
Mortierella elongata	YTM164	JCM 39008	Soil	Yonagunijima- island, Okinawa	С
Mortierella elongata	YTM165	JCM 39009	Soil	Yonagunijima- island, Okinawa	С
Mortierella elongata	YTM170	JCM 39010	Soil	Yonagunijima- island, Okinawa	С
Mortierella sp. 14	YTM171	JCM 39011	Soil	Yonagunijima- island, Okinawa	А
Mortierella alpina	YTM173	JCM 39012	Soil	Yonagunijima- island, Okinawa	С
Mortierella elongata	YTM174	JCM 39013	Soil	Yonagunijima- island, Okinawa	С
<i>Mortierella</i> sp. 14	YTM176s1	JCM 39014	Soil	Yonagunijima- island, Okinawa	В
Mortierella sp. 14	YTM177s	JCM 39015	Soil	Yonagunijima- island, Okinawa	В

Table 1 Isolates of Mortierella spp. associated with endohyphal bacteria

_

Continued on the next page.

西澤智康

Table 1 continued

Continued.

Host fungal species*	Isolate no.	collection no.	Isolation sources	Location	Detected MorBRE group
Mortierella sp. 15	YTM179	JCM 39016	Soil	Yamanashi	В
Mortierella verticillata	YTM181	JCM 39017	Soil	Yamanashi	С
Mortierella sp. 15	YTM184	JCM 39018	Soil	Yamanashi	В
Mortierella sp. 15	YTM185s1	JCM 39019	Soil	Yamanashi	В
Mortierella sp. 15	YTM186s	JCM 39020	Soil	Yamanashi	В
Mortierella humilis	YTM187	JCM 39021	Soil	Yamanashi	А
Mortierella elongata	YTM190	JCM 39022	Soil	Shizuoka	В
Mortierella elongata	YTM210	JCM 39023	Soil	Ibaraki	С
Mortierella sp. 16	YTM212	JCM 39024	Soil	Sadogashima- island, Niigata	С
Mortierella sp. 16	YTM214	JCM 39025	Soil	Sadogashima- island, Niigata	С
Mortierella sossauensis	YTM223	JCM 39026	Plant	Fukushima	В
Mortierella humilis	YTM225	JCM 39027	Plant	Fukushima	А
Mortierella parvispora	E1425	JCM 39028	Soil	Hiroshima	А
Mortierella chienii	E1931	JCM 39029	Soil	Kagoshima	С
Mortierella parvispora	E2010s1	JCM 39030	Soil	Hiroshima	С
Mortierella fluviae ^b	M5	JCM 39031	Soil	Miyakejima- island, Tokyo	А
Mortierella fluviae ^b	M8	JCM 39032	Soil	Miyakejima- island, Tokyo	В
Mortierella fluviae ^b	M10	JCM 39033	Soil	Miyakejima- island, Tokyo	А
Mortierella fluviae ^b	M14	JCM 39034	Soil	Miyakejima- island, Tokyo	А
Mortierella sp. "CBS 118520" ^b	M26	JCM 39035	Soil	Miyakejima- island, Tokyo	А
Mortierella sp. "CBS 118520" ^b	M30	JCM 39036	Soil	Miyakejima- island, Tokyo	С
Mortierella biramosa ^b	M40	JCM 39037	Soil	island, Tokyo	С
Mortierella horticola ^b	M41s	JCM 39038	Soil	island, Tokyo Miyakejima-	С
Mortierella fluviae ^b	M53	JCM 39039	Soil	island, Tokyo Miyakejima-	А
Mortierella fluviae ^b	M54	JCM 39040	Soil	island, Tokyo Miyakejima-	А
Mortierella elongata ^b	M56s	JCM 39041	Soil	island, Tokyo Miyakejima-	С
Mortierella fatshederae ^b	M60	JCM 39042	Soil	island, Tokyo Miyakejima-	C
Mortierella fluviae °	M64	JCM 39043	Soil	island, Tokyo Miyakejima-	C
Mortierella verticillata °	M /U	JCM 39044 CBS 130 66	Soil	island, Tokyo Lancashire, UK	В
month of the service and		200 100.00	0011	Laneasine, OK	2 K

*Host fungal species mostly identified by integrating blastn searches and phylogenetic analyses in Takashima *et al.* (2018b).

^a This species will be described by Takashima et al. (in review).

^b Host fungal species identified by blastn searches using a ITS sequence database constructed in

Takashima et al. (2018b).

^c This isolate was obtained from the culture collection (CBS).

糸状菌-内生細菌の微生物間相互作用現象の解明



Fig. 1. Maximum likelihood phylogenetic tree of *Burkholderiaceae*-related endobacteria (BRE) dwelling in the multiple *Mortierella* species based on partial 16S rRNA gene sequences (1350 positions) using RAxML with the GTRGAMMAI model and bootstrapping (1000 replicates) with the rapid bootstrap analysis option. Bootstrap values >70% were shown at nodes. *Wolbachia pipientis* wRi was used as an outgroup. BRE clades associated with *Mortierella* spp. were classified into MorBRE groups A, B, and C according to 95% of nucleotide identity cutoff.

ド(1リード当たりの平均長:9,877 塩基, N50:13,899 塩基)とIllumina HiSeq2500から約1,487 Mb 分のショー トリードを得た. これらの塩基配列情報は SPAdes を用 いてハイブリッド・アセンブリ解析した後. Pilon で塩 基補正と配列環状化を行い、最終的に1,876,900 塩基の 環状ゲノム配列を得た(Table 2). Dfastを用いてゲノム・ アノテーションした結果. B2-EB株ゲノム上には1.627 個のコーディング領域 (CDS), 2個のリボソーム RNA オペロン (rrn) と 47 個の転移 RNA (tRNA) が推定さ れた. そのうち, COG-Orthology による検索から1,157 個の CDS が同定され、KEGG-Orthology では 1,062 個の CDSが同定された. また, Orthofinderを用いた Orthology 解析の結果, 1,319 個のシングルコピー CDS が推定され、同定された全 CDS の約 81% がシングルコ ピー CDS であり、既知の BRE 内生細菌ゲノムの中で最 も多い割合であった.また、B2-EB株ゲノムのシングル コピー遺伝子数の割合は, M. cysteinexigens (64-66%) を含めた他のBurkholderiaceae科に属する内生細菌 (52-74%) より割合が高かった (Table 2). B2-EB株 のゲノムは、これまでに分離培養されている Burkholderiaceae科に属する糸状菌内生細菌の中で最小 サイズであった.

蛍光顕微鏡および透過型電子顕微鏡による内生細菌の観察

LIVE/DEAD BacLight 染色キットを用いた蛍光顕微鏡 観察では, M. parvispora E1425株の菌糸内に緑色に発 色する生菌の細菌様構造物が見られた(Fig.2A). さら に透過型電子顕微鏡観察から,二重細胞膜をもつ桿状の 細菌様細胞を確認できた(Fig.2B). 細菌様細胞の大き さは約 1.2μ m× 0.4μ mであり,中心に核様体の構造が観 察できた.その構造体の周囲にはリボゾーム様の構造も 多数見られた(Fig.2C). 先行研究において,*M. elongata* FMR23-6株の電子顕微鏡観察から内生細菌*M. cysteinexigens* B1-EB^T株が糸状菌菌糸細胞内の液胞中に 局在することが観察されている(Sato *et al.*, 2010).し かし,*M. parvispora* E1425株では細菌様細胞は宿主糸 状菌菌糸細胞内の脂質体(V)と液胞(L)に接触して いた(Fig.2B).

Mycoavidus 属細菌間の比較ゲノム解析

Uehling et al. (2017)は、分離培養を経ずに宿主糸状菌 -内生細菌共生体をメタゲノム解析して, M. cysteinexigens AG77の完全ゲノム配列を決定したが (Table 2), Mycoavidus 属細菌の分離培養株で完全ゲノム塩基配列 情報を得たのは、これまでに M. cysteinexigens B1-EB^T株 の一例のみであった (Sharmin et al., 2018). M. cysteinexigens B1-EB^T株と B2-EB 株の 16S rRNA 遺伝子相同性 が99.1%であったため、MLSA解析および全ゲノム相同 性検索により塩基配列レベルで種を同定した。内生細菌 B2-EB株の種の同定のため、5個のシングルコピー遺伝 子 (atpD, gyrB, lepA, recA, rpoB) を用いて MLSA 法分 子系統解析を行った. RAxMLを用いた最尤系統樹の結 果から, B2-EB 株が Mycoavidus 属細菌に属するが, 最 も近縁の標準株である M. cysteinexigens B1-EB^T株と比較 して5つのハウスキーピング遺伝子の平均相同性は 93.2%であり、異なる分岐となった(Fig.3A)、さらに、

	Mycoavidus			Parabur	kholderia	Ca. Glomeribacter gigasporarum		
Feature	B2-EB	$B1-EB^T$	AG77	HKI 454^{T}	HKI 456 ^T	BEG34	BEG1	
Topology*	complete	complete	complete	complete	draft	draft	draft	
Size (bp)	1,876,900	2,795,004	2,638,116	3,750,138	3,288,408	1,726,950	2,355,846	
GC ratio (%)	48.9	48.9	49.0	60.7	61.9	54.8	49.7	
No. of CDS	1,627	2,317	2,255	3,878	2,988	1,736	2,499	
COG-orthology no.	1,157	1,949	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
KEGG-orthology no.	1,069	1,174	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Single-copy CDS no. / %	1,319 / 81	1,476 / 64	1,493 / 66	2,204 /57	2,172 / 73	1,280 / 74	1,293 / 52	
rrn No.	2	2	2	3	1	1	1	
tRNA No.	42	41	41	47	52	38	51	

 Table 2
 Genomic features of Burkholderiaceae-related endobacteria

*, Complete indicates a circularized genome.

n.d., No data

糸状菌-内生細菌の微生物間相互作用現象の解明



Fig. 2. Microscopic observations of *Burkholderiaceae*-related endobacteria dwelling in the hyphae of *Mortierella parvispora* E1425. (A) fluorescent microscopic observation of endobacteria within hyphae stained by a LIVE/DEAD[™] *BacLight[™]* bacterial viability kit, and (B) transmission electron microscopic observation of endobacteria within rapid-freezing and freeze-substituted hyphae. Abbreviation: FH, fungal hyphae; EB, endobacterium-like structures; L, lipid bodies; V, vacuoles; M, mitochondria. (C) the enlargement of endobacteria in the red square frame in the (B), arrowheads indicate the nucleoids in the center of endobacterial cells.

全ゲノム相同性検索では、B2-EB株とB1-EB^T株のANI 値が88.6%であることから、新たに分離したB2-EB株 をMycoavidus 属の新種と判断した(Fig.3B).また、 M. cysteinexigens B1-EB^T株の宿主糸状菌M. elongata FMR23-6株は畑土壌から分離されたことから、森林土 壌から分離・培養した宿主糸状菌M. parvispora E1425 株に内生するB2-EB株はM. cysteinexigens B1-EB^T株と は異なる種分化を遂げたと推察される.

B2-EB株において、解糖系遺伝子がほぼ欠失している

が、脂肪酸の生合成、輸送、分解に関わる遺伝子は存在 することから、宿主糸状菌細胞内の脂肪酸を炭素源とし て利用していることが推察された(Fig.4).一方、ア ミノ酸生合成では、B2-EB株は*M. cysteinexigens* B1-EB^T 株と同様にシステイン輸送系の欠失もあり、システイン 要求性に関わる遺伝的根拠が確認できた.さらにB2-EB 株ではアスパラギン、アルギニン、シトルリン、ヒスチ ジン、プロリンの生合成経路に関わる遺伝子も欠失して いたが、5-アミノレブリン酸やミクロシンCの膜輸送系







Fig. 3. Phylogenetic identification of *Mycoavidus* sp. strain B2-EB using (A) an unrooted maximum likelihood phylogenetic tree constructed by RAxML based on a concatenated sequence (11,460 positions in total) of the five housekeeping genes (*atpD*, *gyrB*, *lepA*, *recA*, and *rpoB*), indicating the relative placement of the three endofungal bacterial clades (bold) and other genera in the family *Burkholderiaceae*, and (B) a boxplot of whole genome average nucleotide identity between strain B2-EB and *M. cysteinexigens* B1-EB^T, indicating strain B2-EB as a new species affiliated with the genus *Mycoavidus*. The horizontal lines in (A) show genetic distance, which are support values estimated with 100 bootstrap replicates.

遺伝子群を保有していたことから,宿主糸状菌の細胞内 にあるオリゴペプチドなどの生理活性物質を分解してア ミノ酸を獲得しているのではないか考えられる.以上の ことから,B2-EB株の宿主糸状菌内での生活様式は,宿 主の栄養に依存していると推定された.

B2-EB株ゲノムから、タイプIモジュール型ポリケチ ド合成酵素 (PKS)、リボソーム非依存的ペプチド合成 酵素(NRPS),カロテノイド様アリールポリエン色素 体合成系に関与する二次代謝産物生合成系遺伝子が見出 された.また,IIとIII型分泌機構と一部必須酵素が欠 失したIV型分泌機構,sec-SRP,ツイン・アルギニン透 過系(Tat)に関与する遺伝子群を保有することから, 宿主との相互作用に関与する二次代謝産物を宿主細胞内 に分泌することが示唆された(Fig.4).

糸状菌-内生細菌の微生物間相互作用現象の解明



Fig. 4. Model representing metabolic processes and secretion system assumed from *Mycoavidus* sp. strain B2-EB. Purple crosses show the genes responsible for the pathways or proteins deleted in both B1-EB^T and B2-EB genomes, and red crosses show those deleted only in the B2-EB genome. Blue characters and arrow show the putative genes and pathway present in only strain B2-EB genome. Abbreviation: POT, polyamine transport system; PST, phosphate-specific transport; DPP, dipeptide permease; MCE, mammalian cell entry; FHU, ferrichrome-uptake; EPSs, exopolysaccharides; LPSs, lipopolysaccharides; IM, inner membrane; OM, outer membrane; SEC, general secretion pathway; TAT, twin arginine translocation pathway.

Burkholderiaceae 科内生細菌間の比較ゲノム解析による 微生物間相互作用機序の推定

宿主細胞内の共生細菌では、トランスポゾンやプロ ファージなどの可動遺伝因子の働きによって遺伝子の挿 入・欠失は頻繁に起こり、その後ゲノムサイズが縮小す ると考えられている、ゲノム縮小過程において、DNA 複製・修復に関わる機能が欠失すれば、突然変異の蓄積 が起こり、内生細菌ゲノムはやがて崩壊していく. Mycoavidus 属細菌ゲノムには7.2-11.5%の可動性遺伝 因子(トランスポゾンやプロファージなど)が同定され た(Fig.5A).特に、B2-EB株ゲノムではアミノ酸輸送 系の欠失だけではなく、有機物代謝や転写・RNAプロ セシング制御、シグナル伝達などに関わる遺伝子群が欠 失していることが見出された(Fig.5B).しかし、



Fig. 5. Comparative genomic analysis between *Mycoavidus* sp. strain B2-EB and *M. cysteinexigens* B1-EB^T. A, a synclastic comparison shown by linking homologous gene with gradient grey lines. B, a bar-plot of reduced orthologous group in the B2-EB genome comparing to those in the B1-EB^T genome. COG category: (1) cellular processes and signaling (D, cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; M, cell wall/membrane/envelope biogenesis; N, cell motility; O, post-translational modification, protein turnover, and chaperones; T, signal transduction mechanisms; U, intercellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V, defense mechanisms; W, extracellular structures; Y, nuclear structure; Z, cytoskeleton), (2) information storage and processing (A, RNA processing and modification; B, chromatin structure and dynamics; J, translation, ribosomal structure and biogenesis; K, transcription; L, replication, recombination and repair), (3) metabolism (C, energy production and conversion; E, amino acid transport and metabolism; F, nucleotide transport and metabolism; G, carbohydrate transport and metabolism; H, coenzyme transport and metabolism; I, lipid transport and metabolism; P, inorganic ion transport and metabolism; Q, secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism), (4) poorly characterized (R, general function prediction only; S, function unknown). n, no COG prediction.



Fig. 6. Genome completeness of *Burkholderiaceae* bacteria based on the conservation rate of 568 single-copy genes in the complete genome except for those of *Ca*. Glomeribacter species and *Paraburkholderia endofungorum* HKI 456^T. Genome completeness of each strain was plotted to the genome size (A) and genome GC content (B), respectively. Nine colors show the major genera with sequenced complete genome sequences in the family *Burkholderiaceae*: red, *Mycoavidus*; blue, *Ca*. Glomeribacter; orange, *Parabukholderia*; grey, *Burkholderia*; purple, *Cupriavidus*; aquamarine, *Pandoraea*; forest green, *Ralstonia*; olive, *Lautropia*; pink, *Polynucleobacter*. The closed circles and triangles indicate the bacterial lifestyles of free-living and intracellular, respectively.

B2-EB株のDNA修復系遺伝因子はほぼ保存されていた ため、構成するゲノムが崩壊していく過程に至らず非退 化的なゲノム縮小化が起きたと考えられる.また、 Burkholderiaceae 科細菌ゲノムに保存されている568 個 の標的シングルコピー遺伝子の保有率を比較した結果、 Mycoavidus 属細菌のゲノムから約89%が同定され、最 も近縁の属である糸状菌内生細菌'Ca. Glomeribacter gigasporarum'(保有率,約22-70%)よりも顕著に多かっ た(Fig.6).よって、B2-EB株ゲノムは、宿主糸状菌細 胞内で内生維持に必要不可欠な特異的機能に関与する遺 伝子が残存したと考えられる.

ゲノム解析技術の進展が、微生物の分離・培養、さら に微生物共生体の相互作用機序の解明に大きく貢献して いる. 微生物間共生現象の研究から, 自然界での微生物 の生態の実態がより深く理解され, 微生物の生理生態的 特徴の一つの物質循環の理解の深化や微生物間相互作用 の応用技術へのさらなる開発が期待される.

要 約

真核生物に細胞内共生する細菌は、一般的に自由生活型の近縁な細菌と比較すると縮小したゲノムを保有することが知られている.しかし、そのゲノム縮小化のメカニズムについては未だ不明である.土壌に生息する糸状菌に*Betaproteobacteria 網 Burkholderiaceae*科に属する細菌が内生していることが報告され、内生細菌は植物毒素

の生合成や宿主体内の活性酸素の除去など微生物間相互 作用に関わると考えられている. 我々の先行研究におい て, Mortierella 属糸状菌に属する M. elongata に内生す る細菌のドラフトゲノム情報からシステイン輸送系が欠 失していることを見出し,システイン含有の BCYE a 寒 天培地を用いることで Burkholderiaceae 科に属する新 属・新種の内生細菌 Mycoavidus cysteinexigens B1-EB^T株 を分離培養することに成功した. 本研究では,新たな Mycoavidus 属細菌の分離に成功し,その全ゲノム解析 および比較ゲノム解析を行った結果について報告する.

これまでに計 305 菌株の Mortierella 属菌を分離し. そのうち66菌株にBurkholderiaceae科に属する内生細 菌を検出した.寄託済み1菌株を除く内生細菌保有 Mortierella 属菌株を新たにカルチャーコレクションに寄 託した. 検出された内生細菌の 16S rRNA 遺伝子領域に 基づく分子系統解析から、内生細菌は、Glomeribacter-Mycoavidus クレードに位置し、3つのサブクレードを形 成することが明らかになった. また, Mortierella parvispora E1425株の菌糸体から内生細菌画分を調製し. BCYE α 寒天培地で培養することにより, Mycoavidus 属 細菌の新種と考えられる B2-EB 株の分離培養に成功し た. この B2-EB 株から DNA を抽出し、 Pacbio RS II と HiSeq2500 でシーケンスを行い、ハイブリッド・アセン ブリ解析により全ゲノムを解読した. B2-EB株のゲノム サイズは約1.88 Mb であり、これまでに分離培養されて いる Burkholderiaceae 科に属する糸状菌内生細菌の中で 最小サイズであった. ゲノム解読された Mycoavidus 属 細菌間で比較ゲノム解析を行った結果. B2-EB 株のゲノ ムは, M. cysteinexigensB1-EB^T株と比較して、システイ ン輸送系の欠失だけではなく、有機物代謝や転写・RNA プロセシング制御、シグナル伝達などに関わる遺伝子群 が欠失していることが見出された. また, Mycoavidus 属細菌ゲノムには7.2-11.5%程度のトランスポゾンやプ ロファージなどの可動遺伝因子領域が見つかっている. B2-EB株ではDNA修復系遺伝子のほとんどが保存され ていたことから、構成するゲノムが崩壊していく過程に 至らず非退化的なゲノム縮小化が起きたと考えられる. よって、B2-EB株ゲノムには宿主内での内生維持に必要 不可欠な特異的機能に関わる遺伝子のみが残されている と推察された.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

 Sharmin, D., Guo, Y., Nishizawa, T., Narisawa, K. & Ohta, H. 2017. Genome comparison of two endohyphal bacteria from different geographic origin. 環境微生物系学会合同大会 2017, 8月29-31日, 仙台

- 2) 郭永,小沼奈那美,高島勇介,Dilruba Sharmin,佐藤嘉 則,成澤才彦,真鍋理一郎,高島昌子,大熊盛也,太田 寛行,西澤智康. 2017. An EHB Mycoavidus cysteinexigens enhances in vitro carbon utilization by host Mortierella elongata. 環境微生物系学会合同大会2017,8月29-31日,仙台
- 3) Guo, Y., Takashima, Y., Sharmin, D., Narisawa, K., Ohta, H. & Nishizawa, T. 2018. Genomic analysis of a newly-cultured endohyphal bacterium *Mycoavidus* strain dwelling in the soil fungus *Mortierella parvispora*. 第12回日本ゲノム微生物 学会年会,3月5-7日,京都
- 4)郭永,高島勇介,成澤才彦,太田寛行,西澤智康. 2018. 糸状菌に内生するMycoavidus属細菌のゲノム収縮過程. SATテクノロジー・ショーケース2018,2月8日,つくば
- 5) 郭 永, Dilruba Sharmin, 高島勇介, 成澤才彦, 太田寛 行, 西澤智康. 2018. 糸状菌内生細菌*Mycoavidus*の二次代 謝産物生合成遺伝子の系統解析. 日本土壌微生物学会 2018大会, 6月16-17日, 東広島
- 6) 郭永,高島勇介, Dilruba Sharmin, 佐藤嘉則, 成澤才彦, 太 田寛行, 西澤智康. 2019. Mortierella属糸状菌に内生する Mycoavidus属細菌のゲノム縮小化. 日本土壌微生物学会 2019大会, 6月15-16日, 札幌
- 7) Guo, Y., Takashima, Y., Narisawa, K., Ohta, H. & Nishizawa, T. 2019. Comparative genomics highlights extreme genome reduction in a newly cultured *Mycoavidus*-related endofungal bacterium dwelling in *Mortierella parvispora*. ASM Microbes 2019, June 20-24, San Francisco, United States of America

原著論文

- Sharmin, D., Guo, Y., Nishizawa, T., Ohshima, S., Sato, Y., Takashima, Y., Narisawa, K. & Ohta, H. 2018. Comparative genomic insights into endofungal life styles of two bacterial endosymbionts, *Mycoavidus cysteinexigens* and *Burkholderia rhizoxinica*. Microbes Environ. 33: 66-76.
- 2) Takashima, Y., Seto, K., Degawa, Y., Guo, Y., Nishizawa, T., Ohta, H. & Narisawa, K. 2018. Prevalence and intra-family phylogenetic divergence of *Burkholderiaceae*-related endobacteria associated with species of *Mortierella*. Microbes Environ. 33: 417-427.

保存機関に寄託した菌株

Mortierella sp. YTM18 = JCM 33085 Mortierella sp. YTM19 = JCM 33086 Mortierella sp. YTM23 = JCM 33087 Mortierella sp. YTM25 = JCM 33088 Mortierella sp. YTM35 = JCM 33090 Mortierella sp. YTM36 = JCM 33090 Mortierella sugadairana YTM39 = JCM 33091, NBRC 112366 Mortierella sp. YTM40 = JCM 33092 Mortierella sp. YTM49 = JCM 33093, NBRC 112368 Mortierella sp. YTM50 = JCM 33094 Mortierella sp. YTM53 = JCM 33095

Mortierella sp. YTM78 = JCM 33096 Mortierella sp. YTM104 = JCM 33097 *Mortierella* sp. YTM108 = JCM 33098 Mortierella sp. YTM110 = JCM 33099 *Mortierella* sp. YTM112 = JCM 33100 Mortierella sp. YTM113 = JCM 33101 *Mortierella* sp. YTM115 = JCM 33102 *Mortierella* sp. YTM123 = JCM 33103 Mortierella sp. YTM124 = JCM 33104 Mortierella sp. YTM127 = JCM 39001 *Mortierella* sp. YTM131 = JCM 39002 Mortierella jenkinii YTM133 = JCM 39003 Mortierella sp. YTM134 = JCM 39004 Mortierella sp. YTM135 = NBRC 112369 Mortierella sp. YTM138 = JCM 39005 *Mortierella* sp. YTM139 = JCM 39006 Mortierella sp. YTM160 = JCM 39007 *Mortierella* sp. YTM164 = JCM 39008 Mortierella sp. YTM165 = JCM 39009 Mortierella sp. YTM170 = JCM 39010 Mortierella sp. YTM171 = JCM 39011 *Mortierella* sp. YTM173 = JCM 39012 *Mortierella* sp. YTM174 = JCM 39013 Mortierella sp. YTM176s1 = JCM 39014 Mortierella sp. YTM177s = JCM 39015 *Mortierella* sp. YTM179 = JCM 39016 *Mortierella* sp. YTM181 = JCM 39017 *Mortierella* sp. YTM184 = JCM 39018 Mortierella sp. YTM185s1 = JCM 39019 Mortierella sp. YTM186s = JCM 39020 Mortierella sp. YTM187 = JCM 39021 Mortierella sp. YTM190 = JCM 39022 *Mortierella* sp. YTM210 = JCM 39023 Mortierella sp. YTM212 = JCM 39024 *Mortierella* sp. YTM214 = JCM 39025 Mortierella sp. YTM223 = JCM 39026 Mortierella sp. YTM225 = JCM 39027 Mortierella parvispora E1425 = JCM 39028 Mortierella chienii E1931 = JCM 39029 Mortierella parvispora E2010s1 = JCM 39030 Mortierella sp. M5 = JCM 39031 *Mortierella* sp. M8 = JCM 39032 Mortierella sp. M10 = JCM 39033 Mortierella sp. M14 = JCM 39034 *Mortierella* sp. M26 = JCM 39035 Mortierella sp. M30 = JCM 39036 Mortierella sp. M40 = ICM 39037

Mortierella sp. M41s = JCM 39038 Mortierella sp. M53 = JCM 39039 Mortierella sp. M54 = JCM 39040 Mortierella sp. M56s = JCM 39041 Mortierella sp. M60 = JCM 39042 Mortierella sp. M64 = JCM 39043 Mortierella sp. M70 = JCM 39044

謝 辞

本研究を遂行するにあたり,多大なる助成をいただき ました公益財団法人発酵研究所に深く感謝申し上げま す.また,Mortierella 属菌株の寄託において多大なるご 尽力を賜りました国立研究開発法人理化学研究所バイオ リソース研究センター微生物材料開発室の橋本 陽博士, 岡田元博士に厚くお礼申し上げます.さらに, Mycoavidus 属細菌のゲノム解析においてご尽力をいた だいた茨城大学農学部産学官連携研究員のDilruba Sharmin博士,独立行政法人製品評価技術基盤機構バイ オテクノロジーセンターの三浦隆匡博士に深く感謝い たします.

文 献

- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V., Nikolenko, S., Pham, S., Prjibelski, A., Pyshkin, A., Sirotkin, A., Vyahhi, N., Tesler, G., Aleseyev, M.A. & Pevzner, P.A. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J. Comput. Biol. 19: 455-477.
- Bianciotto, V., Lumini, E., Bonfante, P. & Vandamme, P. 2003. *Candidatus* Glomeribacter gigasporarum' gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 121-124.
- Emms, D.M. & Kelly, S. 2015. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. Genome Biol. 16: 157.
- Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel D.C. & Baine W.B. 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 10: 437-441.
- Fujimura, R., Nishimura, A., Ohshima, S., Sato, Y., Nishizawa, T., Oshima, K., Hattori, M., Narisawa, K. & Ohta H. 2014. Draft genome sequence of the betaproteobacterial endosymbiont associated with the fungus *Mortierella elongata* FMR23-6. Genome Announc. 2: e01272-14.
- Galperin, M.Y., Makarova, K.S., Wolf, Y.I. & Koonin, E.V. 2015. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. Nucleic Acids Res. **43**: D261–D269.

Guo, Y., Matsuoka, Y., Nishizawa, T., Ohta, H. & Narisawa, K.

2018. Complete genome sequence of *Agrobacterium pusense* VsBac-Y9, a bacterial symbiont of the dark septate endophytic fungus Veronaeopsis simplex Y34 with potential for improving fungal colonization in roots. J. Biotechnol. **284**: 31-36.

- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C., Rattei, T., Mende, D.R., Sunagawa S., Kuhn, M., Jensen, L. J., Mering, C. & Bork, P. 2015. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. Nucleic Acids Res. 44: D286-D293.
- Kanehisa, M., Sato, Y. & Morishima, K. 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. J. Mol. Biol. 428: 726-731.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., & Tamura, K. 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief. Bioinform. 9: 299-306.
- 三浦宏一郎,工藤光代 1970.水生不完全菌類のための一寒天培 地. 日本菌学会会報 11: 116-118.
- Mosse, B. 1970. Honey-coloured, sessile Endogone spores. Archiv. Mikrobiol. **74**: 146-159.
- Ohshima, S., Sato, Y., Fujimura, R., Takashima, Y., Hamada, M., Nishizawa, T., Narisawa, K. & Ohta, H. 2016. *Mycoavidus cysteinexigens* gen. nov., sp. nov., an endohyphal bacterium isolated from a soil isolate of the fungus *Mortierella elongata*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **66**: 2052-2057.
- 太田寛行,西澤智康,松岡勇人,高島勇介,成澤才彦2016.土 壌微生物が創る共生の世界 — その先端的研究事例と農業への 応用的研究展開 4.糸状菌に共生する細菌その機能と生態 —. 日本土壌肥料学雑誌 87: 254-259.
- Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P. & Tyson, G.W. 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res. 25: 1043-1055.
- Partida-Martinez, LP. & Hertweck, C. 2005. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. Nature 437: 884-888.
- Partida-Martinez, L.P., Groth, I., Schmitt, I., Richter, W., Roth, M. & Hertweck, C. 2007. Burkholderia rhizoxinica sp. nov. and Burkholderia endofungorum sp. nov., bacterial endosymbionts

of the plant-pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 2583-2590.

- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F. & Peplies, J. 2015. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. Bioinformatics 32: 929-931.
- Sato, Y., Narisawa, K., Tsuruta, K., Umezu, M., Nishizawa, T., Tanaka, K. Yamaguchi, K., Komatsuzaki, M. & Ohta, H. 2010. Detection of betaproteobacteria inside the mycelium of the fungus *Mortierella elongata*. Microbes Environ. 25: 321-324.
- Sharmin, D., Guo, Y., Nishizawa, T., Ohshima, S., Sato, Y., Takashima, Y., Narisawa, K. & Ohta, H. 2018. Comparative genomic insights into endofungal life styles of two bacterial endosymbionts, *Mycoavidus cysteinexigens* and *Burkholderia rhizoxinica*. Microbes Environ. 33: 66-76.
- 高島勇介,太田寛行,成澤才彦 2015. 糸状菌,特にエンドファイトの諸形質を内生細菌がコントロールするのか? 土と微生物 69: 16-24.
- Takashima, Y., Degawa, Y., Ohta, H., & Narisawa, K. 2018a. *Mortierella sugadairana*, a new homothallic species related to the firstly described heterothallic species in the genus. Mycoscience 59: 200-205.
- Takashima, Y., Seto, K., Degawa, Y., Guo, Y., Nishizawa, T., Ohta, H. & Narisawa, K. 2018b. Prevalence and intra-family phylogenetic divergence of *Burkholderiaceae*-related endobacteria associated with species of *Mortierella*. Microbes Environ. 33: 417-427.
- Tanizawa, Y., Fujisawa, T. & Nakamura, Y. 2018. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. Bioinformatics 34: 1037-1039.
- Uehling, J., Gryganskyi, A., Hameed, K. *et al.*, 2017. Comparative genomics of *Mortierella elongata* and its bacterial endosymbiont *Mycoavidus cysteinexigens*. Environ. Microbiol. **19**: 2964-2983.
- Walker, B.J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C.A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S.K. & Earl, A.M. 2014. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. PLoS One 9: e112963.

超高発酵菌体外多糖産生,新規乳酸菌の探索と 次世代シンバイオティック機能性評価 木 村 郁 夫

東京農工大学大学院農学研究院 〒183-0054 東京都府中市幸町3-5-8

Screening of exopolysaccharide high-producing lactic acid bacteria and symbiotic functional evaluation

Ikuo Kimura

Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 183-8509, Japan

Metabolic disorders, such as obesity and diabetes, arise from disrupted energy homeostasis that depends upon the equilibrium between energy intake and expenditure. Gut microbiota has emerged as a pivotal, multifactorial mediator in these disorders as it remarkably regulates host energy acquisition and metabolism while being modified by diet. Short-chain fatty acids (SCFAs) represent an essential subset of gut microbial metabolites derived from the fermentation of the indigestible dietary fiber. We previously reported that SCFAs play an important role in the regulation of energy homeostasis via specific receptors (e.g., GPR41 and GPR43) that are present in host tissues. Recent evidence suggests that indigestible polysaccharides such as dietary fiber and the gut microbial-derived SCFAs exert multiple beneficial effects on host energy metabolism. In this study, we investigated the roles of the gut microbiota-derived exopolysaccharides (EPS) in host energy metabolism and evaluated several EPS in detail in order to provide insight into the development of new drugs and functional foods that are effective against the energy-metabolism associated disorders. We isolated and identified several high-EPSproducing bacteria in gut microbes by screening. Moreover, we confirmed that the administration of these purified EPS to mice markedly increased SCFAs production in the intestine and thereby improving host metabolic functions. Further study including human trial is needed to apply these novel EPS and EPS-producing bacteria as the functional foods against the metabolic disorders.

Key words: exopolysaccharide, gut microbiota, dietary fiber, short-chain fatty acids, obesity

緒 言

近年の腸内細菌叢研究により,腸内細菌が宿主のエネ ルギー調節や栄養摂取に関与し,肥満や糖尿病等のエネ ルギー代謝疾患に直接的な影響を及ぼすことが判明し, 我々もこの分野で多数成果を挙げてきた(Ohue-Kitano *et al.*, 2019, Watanabe *et al.*, 2018, Nakatani *et al.*, 2018). したがって,腸内環境を改善するための生菌摂取による プロバイオティクスや,腸内細菌の餌となる食物繊維等

E-mail: ikimura@cc.tuat.ac.jp 共同研究者:中島 啓(東京農工大学大学院) 宮本潤基(東京農工大学大学院) のプレバイオティクス摂取を介した予防医学・健康増進 戦略への関心は食品科学の観点からも益々高まってい る.この中で、食物繊維等の難消化性多糖を腸内細菌が 発酵することで産生する短鎖脂肪酸が、宿主側の生理機 能発現の主要因であると注目され、我々を含む近年の報 告(Miyamoto *et al.*, 2018, Nakajima *et al.*, 2017, Kimura *et al.*, 2013, Kimura *et al.*, 2011)により、その重要性が 世界的にも認識され始めている、したがって、腸内発酵 応用により食品の機能性を発揮するための戦略として、 如何に腸内において短鎖脂肪酸の質と量を制御するかが 重要である.

そこで,我々は食と腸内環境に基づいた生活習慣病予防・治療戦略として,腸内細菌の宿主への有用効果の源

を腸内細菌発酵産物,短鎖脂肪酸と捉え,その増幅によ る機能性発現に着目した研究に焦点をおいた.従来の食 物繊維-プレバイオティクスの概念を一新し,菌体外多 糖(Exopolysaccharide:EPS)-プレバイオティクスに 着目することにより,新規EPS産生腸内細菌群の探索 を行う.そして,単一菌によるプロバイオティクスとプ レバイオティクスの両方の効果を併せ持つ次世代シンバ イオティクスという新たな概念の実証と,新規機能性食 品素材分野として世に普及させることを目指し,本研究 を行った.

実験方法

EPS 産生菌株の培養と単離

当研究室で保有するヒト糞便サンプルより得られた, ヒト由来腸内細菌群から高効率 EPS 産生菌について, 嫌気環境下,プレート培養により単離し,ゲノム抽出後, 16S rRNA 配列を指標に菌種同定を行った.更に中規模 液体培養によりそれらの菌株からそれぞれの EPS の精 製を行った.

マウス実験

精製したそれぞれのEPSを10%の割合で混餌し、マ ウスに14日間摂取させ、マウス糞便中短鎖脂肪酸産生 量を GC/MS を用いて測定することにより腸内短鎖脂肪 酸高産生 EPSを選抜した. さらに. 短鎖脂肪酸高産生 EPSを用いて、12週間の10%EPS含有高脂肪食摂取を 行い.肥満誘導マウスへの EPS 投与における代謝機能 改善作用について検討を行った(この時の EPS のコン トロールとして、難発酵性多糖であるセルロースを用い た). その時の腸内細菌叢変化について、次世代シーク エンサーを用いて16S rRNAを指標に解析し、糞便中短 鎖脂肪酸をGC/MSにより定量した.また、そのEPS を産生する菌株が生体内で実際に EPS を産生している かを確認するために、無菌アイソレーター内で飼育を 行っている無菌マウスへの EPS 産生菌株の移植実験を 行った.そして、EPS産生菌移植によるマウス腸内で の EPS の産生および短鎖脂肪酸の産生量,そして代謝 機能改善効果について調べた.

結果および考察

ヒト糞便より EPS 高産生菌の単離と精製

先ず初めに、当研究室において保管しているヒト便サ ンプルの希釈液を、独自に作製したEPS 産生菌特異的 選択寒天培地上に播種し、EPS 産生菌の単離を行った. EPS を産生していると予想される粘性をもつ巨大コロ ニーをピックアップし、実際にLC/MS/MSを用いて、 高分子多糖を含むコロニーであることを確認した (Fig.1A). コロニーの形状を指標に、EPS産生菌を単 離し、16S rRNA 配列による簡易菌種同定を行い、ヒト 腸内細菌由来 EPS 高産生菌株多数の単離・同定に成功 した.実際、高EPS産生菌は10人に1人の割合で検出 できた.また、菌種同定の結果、高EPS産生菌は、属 レベルでも異なった菌が多数存在することがわかった (Fig.1B).さらに、これらの菌からEPSを大量に精製 するために液体培養での精製を試みたが、いくつかの菌 に関して、液体培養ではEPS産生能の低下が確認され たため、高収率(10mg/ml以上)で回収可能なEPSか ら先ず、精製を行った(Fig.1C).

精製 EPS の *in vivo* 投与試験(短鎖脂肪酸産生から代謝 機能への影響)

精製した EPS に関して、マウスへの14日間投与実験 により、短鎖脂肪酸産生量を指標に高発酵性 EPSを選 出した(Fig.2A). 糞便中短鎖脂肪酸(酢酸・プロオピ オン酸・酪酸)に関して、最も産生量の高い EPS (strain A由来)を用いて、高脂肪食誘導肥満マウスに対する EPS 長期負荷試験を行った. コントロール食には、EPS の代わりに腸内細菌によって難発酵性の食物繊維である セルロースをEPSと同量加えた.結果,EPS摂取により、 セルロース摂取と比較し、高脂肪食による体脂肪重量増 加に対する有意な抑制効果が確認できた(Fig.2B).さ らに、EPS 単回投与による即時的な代謝機能への影響 として、EPS 摂取は、マウス経口ブドウ糖負荷試験に おける血糖値の上昇を有意に抑制できることがわかった (Fig.2C left). 食物繊維由来短鎖脂肪酸は, 短鎖脂肪酸 受容体 GPR41 や GPR43 を介し, 腸管ホルモン GLP-1の 分泌や,直接的な膵臓β細胞からのインスリン分泌を促 進することで糖代謝改善に関わっていると報告されてい る (McNelis et al., 2015; Tolhurst et al., 2012). したがっ て, 我々は更に, 同様の検討を GPR41 や GPR43 遺伝子 欠損マウスで行ったところ, EPS 単回投与時に見られ た血糖上昇抑制効果が消失した(Fig.2C middle). また, 腸内細菌の全く存在しない無菌マウスにおいても同様の 検討を行った結果,こちらも EPS による効果が消失し た (Fig. 2C right). このことは、EPS 摂取による血糖 上昇抑制が, EPSから腸内細菌によって産生される短 鎖脂肪酸がその受容体を介してインスリン分泌を促進す ることにより、発揮されたことを示唆している、以上の 結果より、我々はマウスにおいて EPS 摂取が代謝機能 を改善することおよびそのメカニズムが腸内細菌を介し た短鎖脂肪酸産生とその受容体を介して発揮されること を証明した.



В





木村郁夫



Fig. 2. Metabolic benefits by EPS administration to mice.

(A) Measurement of short-chain fatty acids (SCFAs; acetate, propionate, butyrate) in mouse feces with EPS supplementation for 2 weeks (n=8). (B) Body, adipose, and liver weights of high fat diet fed mice with EPS supplementation for 12 weeks (n=8). WAT, white adipose tissues; epi, epididymal; peri, perirenal; sub, subcutaneous. (C) Oral glucose tolerance tests in wild-type (left), *Gpr41*- or *Gpr43*-deficient (middle), and germ-free (right) mice were analyzed 1h after EPS administration (n=8). **P<0.01; *P<0.05 (Student's t test). Results are presented as means ± SE.

精製 EPS の *in vivo, in vitro* 投与試験(腸内細菌叢への 影響)

12週間 EPS 長期摂取時の腸内細菌叢の変化をメタ 16S 菌叢解析によって検討した.結果,セルロース摂取 群と比較して,痩せ型に多いとされている Bacteroides 属の割合の上昇が確認できた(Fig.3A).また,この時 の糞便中短鎖脂肪酸に関しても短期負荷試験(14日間) と比較して更なる上昇が確認できた(Fig.3B).以上よ り,EPSの摂取は腸内細菌叢を改善し,短鎖脂肪酸の 産生を促すことより,生体において有益な効果をもたら



Fig. 3. Change in gut microbial composition by EPS supplementation.
(A) The relative abundance of microbial taxa in mouse feces with 10% EPS supplementation for 12 weeks (n=4). (B) Quantitation of short-chain fatty acids (acetate, propionate, butyrate) in mouse feces with 10% EPS supplementation for 12 weeks (n=8). **P<0.01 (Student's t test). Results are presented as means ± SE.

すと推測される.次に、このEPSを分解(資化)でき る腸内細菌種の特定を in vitro 腸内細菌培養系により検 討を行った(元石川県立大学山本憲二教授との共同研 究).59種の腸内細菌に対し、EPSの資化性を確認した ところ、Bifidobacterium 属、Clostridium 属、Lactobacillus 属や Ruminococcus 属ではなく、Bacteroides 属特異的に EPS が資化された.このことは、EPS 負荷によるマウ ス腸内細菌叢変化の結果とも一致する.

高 EPS 産生菌のノトバイオート実験

最後に、実際に我々の単離した EPS 産生菌が生体内 で EPS を産生し、この EPS が腸内細菌による発酵をう け、産生する短鎖脂肪酸が宿主の代謝機能を改善させる かをノトバイオート実験により、検討した. 最初に無菌 マウスに EPS 産生菌と EPS 非産生菌をそれぞれ移植し た.14日間の高脂肪食摂取・高糖質飲水の結果,EPS 非産生菌を移植したマウスにおいて体脂肪重量の上昇が 確認されたが、EPS 産生菌の移植では、その効果が無 菌マウスと同程度であった(Fig.4A).また、血糖値に 関しても EPS 産生菌では EPS 非産生菌に比べて低い傾 向を示した. この時, in vitro 腸内細菌培養系で確認し たEPS 資化性の高い Bacteroides stercoris も同時に移植 したところ、EPS 産生菌と B. stercoris の2 菌株移植に関 して無菌マウスと比較して有意に血糖値を減少させた (Fig.4B). この効果はEPS 非産生菌とB. stercorisの2 菌株移植では確認できなかった.また,同様にEPS 非 産生菌では検出されなかったが、EPS 産生菌移植では

盲腸中に高分子多糖が検出でき(Fig.4C), 糞便中短鎖 脂肪酸に関しても EPS 非産生菌ではなく, EPS 産生菌 と EPS 資化菌である *B. stercoris* の2菌種の移植により, 有意な上昇が確認できた(Fig.4D).以上, EPS 産生菌 および EPS 資化菌のノトバイオート実験から, 糖質負 荷による EPS 産生→ EPS 資化→短鎖脂肪酸産生→宿主 代謝機能改善作用が確認された.

このように、一部の腸内細菌は宿主腸内において EPS を産生し、その EPSを別の腸内細菌が資化することに よって短鎖脂肪酸が産生され、この短鎖脂肪酸が宿主の エネルギー代謝機能に影響を及ぼす腸内細菌 - 宿主の 作用メカニズムの一端が本研究によって示唆された. し かしながら、本研究内では、実際の腸内細菌叢全体が腸 管内で EPS を産生し、それらが宿主側にどのような影 響を与えているかを証明するには至っていない. EPS 産生菌は多種にわたり、産生される EPS も非常に多種 多様であるため、今後、この複雑共生系の証明を精力的 に進める必要がある.

要 約

EPS 産生量を指標に10株以上のリード EPS 産生菌の 選抜が出来た.うち、3株以上に関して、EPS の精製を 行い、マウスへの投与実験から腸管内での短鎖脂肪酸の 高産生が確認できた.また、これら EPS 資化性の高い 腸内細菌の同定も完了し、EPS 産生菌と EPS 資化菌の ノトバイオート実験から、高糖質食負荷による EPS 産 木 村 郁 夫



Fig. 4. Gnotobiotic mice transferred EPS-producing bacteria.
(A) Body weight and adipose weight, and (B) plasma glucose at 10 weeks of age were measured in high fat diet fed GF and gnotobiotic mice for 1 weeks (n=8). (C) Measurement of polysaccharides in cecum by LC and (D) short-chain fatty acids in feces (n=5-8). EPS(+), EPS-producing strain; EPS(-), EPS-non-producing type strain. ***P*<0.01; **P*<0.05; #*P*<0.05 (Tukey–Kramer test). Results are presented as means ± SE.

生→EPS 資化→短鎖脂肪酸産生→代謝機能改善作用の 確認もできた. さらには,実際にマウス実験において, EPS 投与による代謝機能の改善効果も確認できたこと から,現在,うち1種類に関してはヒト臨床試験への移 行の準備を進めている.本研究課題により,数種類のシー ドEPS 産生菌の抽出ができたので,今後,研究の規模 をさらに拡大し,大規模培養の確立・臨床応用に向けて, 更なる研究展開が必要である.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 木村 郁夫. 2019. 菌体外多糖と肥満・糖尿病「腸内細菌叢 由来代謝物質がもたらす生体恒常性と疾患」, 第19回 日本 抗加齢医学会, 6月14日, 東京
- 2) 木村 郁夫. 2017. 腸内細菌代謝産物による宿主エネルギー 制御機構「代謝異常と腸内細菌」,第51回糖尿病学の進歩, 2月18日,京都
謝 辞

本研究の遂行にあたり,助成頂きました公益財団法人 発酵研究所に深く感謝致します.また,微生物培養実験 で御協力頂きました石川県立大学 元教授 山本 憲二 先 生,助教 松崎千秋 先生,EPSの発酵合成・精製で御協 力頂きました日東薬品工業株式会社の久 景子様,清水 秀憲様に厚く御礼申し上げます.

文 献

- Kimura, I., Inoue, D., Maeda, T., Hara, T., Ichimura, A., Miyauchi, S., Kobayashi, M., Hirasawa, A. & Tsujimoto, G. 2011. Shortchain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via GPR41. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108: 8030-8035.
- Kimura, I., Ozawa, K., Inoue, D., Imamura, T., Kimura, K., Maeda, T., Terasawa, K., Kashihara, D., Hirano, K., Tani, T., Takahashi, T., Miyauchi, S., Shioi, G., Inoue, H. & Tsujimoto, G. 2013. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. Nat. Commun. 4: 1829.
- McNelis, J.C., Lee, Y.S., Mayoral, R., van, der, Kant, R., Johnson, A.M., Wollam, J. & Olefsky, J.M. 2015. GPR43 potentiates betacell function in obesity. Diabetes 64: 3203–3217.
- Miyamoto, J., Watanabe, K., Taira, S., Kasubuchi, M., Li, X., Irie, J., Itoh, H. & Kimura, I. 2018. Barley β-glucan improves metabolic condition via short-chain fatty acids produced by gut

microbial fermentation in high fat diet fed mice. PLoS One 13: e0196579.

- Nakajima, A., Nakatani, A., Hasegawa, S., Irie, J., Ozawa, K., Tsujimoto, G., Suganami, T., Itoh, H. & Kimura, I. 2017. The short chain fatty acid receptor GPR43 regulates inflammatory signals in adipose tissue M2-type macrophages. PLoS One 12: e0179696.
- Nakatani, A., Li, X., Miyamoto, J., Igarashi, M., Watanabe, H., Sutou, A., Watanabe, K., Motoyama, T., Tachibana, N., Kohno, M., Inoue, H. & Kimura, I. 2018. Dietary mung bean protein reduces high-fat diet-induced weight gain by modulating host bile acid metabolism in a gut microbiota-dependent manner. Biochem. Biophys. Res. Commun. 501: 955-961.
- Ohue-Kitano, R., Taira, S., Watanabe, K., Masujima, Y., Kuboshima, T., Miyamoto, J., Nishitani, Y., Kawakami, H., Kuwahara, H. & Kimura I. 2019. 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid produced from 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid by gut microbiota improves host metabolic condition in diet-Induced obese mice. Nutrients 11: 1038.
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y.S., Parker, H.E., Habib, A.M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F. & Gribble, F.M. 2012. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. Diabetes 61: 364–371.
- Watanabe, K., Igarashi, M., Li, X., Nakatani, A., Miyamoto, J., Inaba, Y., Sutou, A., Saito, T., Sato, T., Tachibana, N., Inoue, H. & Kimura, I. 2018. Dietary soybean protein ameliorates high-fat diet-induced obesity by modifying the gut microbiota-dependent biotransformation of bile acids. PLoS One 13: e0202083.

魚類体表微生物叢の網羅的解析と感染予防効果の検討: 抗生物質を代替する養殖魚類表皮版プロバイオティクスの 確立を目指して

堀 克 敏

名古屋大学工学研究科 〒464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町

Fish skin microbiome analysis for prevention of pathogen: A preliminary study for development of 'fish skin probiotics'. Katsutoshi Hori

Graduated School of Engineering Nagoya University Furo-cho, Chikusa, Nagoya, Aich 464-8603, Japan

The importance of fish disease control is increasing in order to improve the productivity of aquaculture. As a practical method for fish disease control, we have proposed a concept of "fish skin probiotics" in aquaculture. In this study, we analyzed fish skin bacterial microbiota during the percutaneous infection to explore the feasibility of this concept. Zebrafish (Dani rerio) was used as a model fish. The fishes were given the combination of stress conditions such as temperature shift, skin injury, and administration of antibiotics during infection experiments, and then exposed to Yersinia ruckeri, an important trout pathogen. Progress of the infection was diagnosed by observation of specific symptoms. The changes of skin bacterial flora were analyzed by comprehensive sequencing of 16S rDNA amplicon using a next generation sequencer (NGS). The infection of Y. ruckeri to zebrafish was observed among the injured fishes at 20° C, and most of the fishes died in 7 days after the pathogen challenge. The skin bacterial floras of dead fish were occupied by the pathogen, suggesting that the pathogen infected percutaneously. In order to investigate the relationship between the skin bacterial flora and Y. ruckeri infection, the floras at 20° were compared with those at 28° . At 20° , the replacement of the major bacteria in the floras and the increase in the abundance of OTUs containing pathogenic and parasitic bacteria were observed. The effects of the injury and the challenge of Y. ruckeri on the skin bacterial flora were compared among the experimental groups at 28°C and 20°C except for the dead condition (pathogen challenge after injury) by volcano plot and β -diversity analyses. The results suggested that the quantitative change in bacterial floras occurred by the challenge of Y. ruckeri and injury. Infection experiments were then conducted with the fishes, whose skin bacterial floras were destroyed by antibiotic treatment. Although most fishes survived after the pathogen challenge, the skin bacterial floras were occupied by Y. ruckeri. These results suggest that the zebrafish skin bacterial flora usually prevents colonization of Y. ruckeri to the skin, and that physiological stresses such as low temperature, injury, and antibiotic treatment cause dysbacteriosis of the skin bacterial flora and dysfunction of the skin barrier, resulting in the increases in the susceptibility to infection. Furthermore, we analyzed the skin bacterial floras of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), which is known as a natural host of Y. ruckeri, in order to observe the changes of the floras during breeding in a fish farm. The skin bacterial floras depended on the fish growth stage and breeding water. The data imply that the change of the skin bacterial flora in the process of aquaculture affects the infection sensitivity against Y. ruckeri.

Key words: microbiome, fish skin, Yersinia ruckeri, probiotics

E-mail: khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

共同研究者:中谷 肇(名古屋大学工学研究科)

田丸 浩 (三重大学生物資源学研究科)

緒 言

水産養殖は世界の魚介類消費量の増加とともに急激な 成長を遂げてきた.1974年には食用向け魚介類生産量 のうちわずか7%を占めているにすぎなかったが,この シェアは2014年には45%まで上昇し,2025年には50% を超えると予測されている(FAO,2018).このように, 今後も発展が見込まれる水産養殖の生産性や経済性を維 持するために,魚病対策は大きな課題となっている (Leung & Bates, 2013).

魚病対策として抗生物質はその簡便さと適応範囲の広 さから世界中の養殖場で利用されてきたが、薬剤耐性菌 の出現が問題となった.薬剤耐性菌は抗生物質が使用さ れる様々な環境で出現する可能性があり、世界的な関心 を集める大きな環境問題となっている(Cantas *et al.*, 2013; Kelly & Davies, 2017). これらのことから抗生物 質の使用が世界的に規制され始め(Kelly & Davies, 2017),日本でも厚生労働省が2016年に「薬剤耐性菌対 策アクションプラン」を発表しその利用が規制されつつ ある.

このようなことから,抗生物質に代わる魚病対策が模 索された結果,水産用ワクチンの開発が盛んに行われ, いくつかの魚病に対しては実用化もされている (Sommerset et al., 2005).しかしながらワクチンは特定 の病原菌にしか効果を示さないことに加え,抗原や添加 剤を適切にデザインしなければ効果の高いワクチンを得 ることができないことから開発までに多くの時間と費用 を必要とする.よって様々な病原菌に対抗できるだけの, 有効なワクチンの開発が追い付いていないのが現状であ る (Sommerset et al., 2005).

抗生物質やワクチンとは異なる魚病対策のアプローチ として、プロバイオティクスの魚類への利用がある.プ ロバイオティクスとは,経口投与によって腸内で一定期 間生存し、宿主に有益な効果をもたらす微生物やそれら を含む食品のことであり、魚類のプロバイオティクスに ついても、1980年代から研究が始められ、病原菌に対 する拮抗作用を示すものや, 魚類の免疫機能を強化する もの、魚類の成長を促進するものなど様々な有用微生物 がすでに発見されている (Zorriehzahra et al., 2016; Hoseinifar et al., 2018). 投与方法は簡便であり、有用微 生物を餌に混ぜることや飼育水中に播種することで経口 投与させる方法が一般的に行われている (Gatesoupe, 1999; Verschuere et al., 2000; Irianto & Austin, 2002; Zorriehzahra et al., 2016; Hoseinifar et al., 2018). このよ うなプロバイオティクスの主な作用機序の一つは、腸内 細菌叢の改善によるものであると考えられており、近年 ではプロバイオティクスと腸内細菌叢との関係性に着目

して研究が進められている (Shreiner *et al.*, 2015; Giatsis *et al.*, 2016).

一方で,魚類は水中で生活することから,空気中より もはるかに多くの活性の高い微生物に体表面がさらされ ることになる.魚類の表皮はこういった微生物から宿主 を物理的,免疫的に守る障壁の役割を担っている.特に 表皮を覆っている粘膜は水と常に接しているため,環 境の変化,栄養状態,共生微生物または病原菌の干渉 など多くの外的な要因に適応しなければならない重要 な組織である (Gomez *et al.*, 2013; Peatman *et al.*, 2013; Brinchmann, 2016).

水産養殖では生産性をあげるため魚を過密飼育してい ることが多く,魚同士の喧嘩や衝突,壁や網との摩擦な どにより表皮が傷つくリスクが高まっている.表皮上に できた傷口からは病原菌が粘膜の壁を突破して体内に侵 入しやすく,表皮が傷ついた魚について,病原菌の感染 による死亡率が大幅に上昇することが報告されている (Liu et al., 2015).したがって,養殖魚の病害防除を微 生物によって行うのであれば,これまでのプロバイオ ティクス研究のように腸管だけに着目するだけでは十分 ではなく,表皮にも着目するべきだと考えられる.しか しながら魚類において表皮を対象としたいわば「表皮版 プロバイオティクス」については,世界でも全く検討さ れていない.

魚類表皮版プロバイオティクス技術の実現可能性を探 るためには、通常のプロバイオティクスである腸管を対 象としたものと同様に、対象となる器官・組織における 細菌叢との関係を明らかにしていく必要がある.魚類に おいて表皮細菌叢を解析した例はさまざまな魚種で報告 されているほか、魚種や遺伝的背景が異なる個体間、生 育環境の違いにより細菌叢が異なること、水のpHの変 化や、養殖場での魚の取り扱いによって表皮細菌叢が変 化することが報告されている(Larsen et al., 2013; Boutin et al., 2014; Sylvain et al., 2016; Minniti et al., 2017; Uren Webster et al., 2018).しかしながら、その細菌叢 の違いや変化が養殖において魚病の防除にどのような役 割を示すのかは不明である.

本研究では病害防除における表皮細菌叢の重要性について明らかにするために,主としてサケ・マス類にレッドマウス病を引き起こすことが知られている Yersinia ruckeri (Kumar et al., 2015)をモデル魚類であるゼブラフィッシュに経皮感染させる条件を探索した.また,表皮感染を引き起こす飼育条件において,ゼブラフィッシュの表皮細菌叢の変化を解析した.また,養殖場のニジマスにおける表皮細菌叢の変遷を解析した.

実験方法

使用した病原菌株と培養条件

本研究で使用した魚の病原性細菌 Yersinia ruckeri NVH 3758株はノルウェーにて病気のニジマスより単離 された株であり、オスロ大学の Dirk Linke 教授より分 譲していただいた、培養には LB 培地(Miller)を用い、 感染実験には28℃で24時間振盪培養したものを用いた.

ゼブラフィッシュの管理

感染実験に用いたゼブラフィッシュ(Danio rerio) の成魚は三重大学田丸研究室にて1年以上飼育された個 体を入手し、感染実験を行うまで三重大学とは異なる飼 育水にて管理した.飼育に用いた水槽は CROSS MINI (NWC-341; NISSO)を使用した.餌はテトラミンスー パー(17653; スペクトラム ブランズ ジャパン)を Tetra Auto Feeder(AF-3; スペクトラム ブランズ ジャ パン)で1日2回12時間おきに与えた.照明にはTetra LED Mini Light(73333; スペクトラム ブランズ ジャパ ン)を使用し、簡単デジタルタイマー(PT70DW; REVEX)で12時間ごとに点灯と消灯を行った.水温は セーフカバーヒートナビ SH80(7775; ジェックス)を 使用して28℃に維持した.

ゼブラフィッシュへの病原性細菌の感染実験

滅菌水にオートクレーブ滅菌した Instant Ocean Sea Salt (NPQO) の溶液を添加し、海水塩が3g/L (海水 の10%)に調整した滅菌飼育水を作成した、滅菌飼育 水にトリカイン溶液(4.0mg/mlトリカイン, 0.021M Tris) 2mlを加え麻酔液とした. 麻酔をかけた後, 1か 所刺し傷をつけた.滅菌飼育水300mlを500mlフラス コに用意し、傷つけた成魚を移し麻酔の影響が切れたこ とを確認した後,24時間20℃もしくは28℃で飼育した. コントロール群として傷をつけない魚も上記の条件で同 時に飼育した.24時間後,飼育水に病原菌を添加した. 病原菌を暴露してから新しい滅菌飼育水に交換し. 20℃のインキュベーター内で最長7日間飼育した. 感染 実験に供したゼブラフィッシュは3-12時間おきに観察 し、衰弱しているか、もしくはレッドマウス病が疑われ る症状が出ているかによって感染の評価を行った.症状 が見られた、もしくは死亡したゼブラフィッシュは随時 フラスコから回収した. その際コントロール群からも, 感染群から回収したゼブラフィッシュと同じ匹数のゼブ ラフィッシュを同時に回収した. 飼育水の交換から7日 間経過した時点でも症状が見られなかったゼブラフィッ シュもすべてフラスコから回収した.

また、実験が終了した時点での飼育水中に含まれる細

菌フローラを,フィルター (E045A047A,孔径 0.45μm, 直径 47mm; ADVANTEC) で吸引濾過して回収した.

抗生物質で魚を処理する場合は500mLのフラスコに 滅菌飼育水と抗生物質を加え,飼育した.その後滅菌飼 育水を新しいものに交換し,20℃のインキュベーター 内で,病原菌を加える条件と加えない条件で最大7日間 飼育した.

ゼブラフィッシュ表皮からの細菌ゲノムの抽出

曝露実験終了後,フラスコから回収した個体は過剰量 のトリカインを含む滅菌飼育水中にて安楽死させると同 時に,表皮に付着した飼育水を洗い流した.死亡させた ゼブラフィッシュから表皮ごと付着している細菌叢を採 取した.回収した表皮サンプルは滅菌済み1.5mlチュー ブに移し,-30℃で冷凍保存した.

表皮サンプルからの細菌ゲノム DNA の抽出・精製に はキットを用いた (NucleoSpin Tissue; タカラバイオ). その際, グラム陽性細菌などの細胞の破砕が難しい細菌 ゲノム DNA を回収するためのプロトコルに従い, リゾ チーム溶液 (20 mg/ml リゾチーム; 127-06724; 和光純薬 工業, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100) によって 37℃で1時間サンプルの前処処理を行った.

次世代シーケンサー iSeq100 による 16S rDNA アンプリ コンライブラリーのシーケンシング

抽出したゲノム DNA から, 原核生物のみが持つ 16S rDNA の V4 領域を対象として, iSeq100 (illumina) を 用いてシーケンスを行うための 16S rDNA アンプリコンライ ブラリーを調製した. ライブラリー作成には以下のプロトコ ル (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation; 15044223 Rev. A; illumina) を参考にして行った. ただ し抽出ゲノムからの 16S rDNA V4 領域の増幅には Ex Taq (RR001A; タカラバイオ株式会社)を用い, アニー リング温度を 50.7℃に設定した. 増幅に用いたプライ マーは Earth Microbiome Project (http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/) Version 4_13 (updated April 2016) で紹介されたものを使用し, オーバーハング (イルミナアダプター配列)が領域特異 的配列に追加された配列組成のものを用いた. プライ マーの配列は以下の通りである.

Forward Primer:

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTG YCAGCMGCCGCGGTAA Reverse Primer: GTCTCGTGGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGG ACTACHVGGGTWTCTAAT 25 サイクルの PCR を行い増幅が終了したサンプルのう ち11 サンプルを無作為に選び、増幅産物を含む反応液 の一部を採取し、3~5倍に超純水で希釈した後、バイ オアナライザー電気泳動システム(Agilent 2100)を用 いて電気泳動し、増幅産物の状態を確認した.残りのサ ンプルに含まれる増幅産物をAMPure XPビーズ (A63881: ベックマン・コールター株式会社)を使用し て精製した.精製したアンプリコンに、Nextera XT v2 キットを用いて、シーケンサーに必要なアダプター配列 とインデックス配列を8サイクルのPCRによって付加 した. ポリメラーゼは2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)を用いた. シーケンスに必要なアダプターを付加したアンプリコン を再びAMPure XPビーズを使用して精製し解析用ライ ブラリーを得た.精製したライブラリーの一部をバイオ アナライザーで電気泳動し、ライブラリーの大きさを確 認した. ライブラリー濃度を Qubit 4 dsDNA BR Assay Kit (Q32853; ThermoFisher SCIENTIFIC) を用いて測 定した. 測定した結果に基づき, 各サンプルのライブラ リーを 50 pM 含むライブラリーを作製した.シーケンス データのクオリティーを高めるために PhiX Control v3 (FC-110-3001 illumina) をライブラリーに添加した.調 製したシーケンスサンプルは、以下のプロトコル (iSeq 100 Sequencing System Guide; 1000000036024 v00 JPN; illumina)を参考にしてシーケンスを行った.

16S rDNA アンプリコンシーケンスに基づく In silico 解析

シーケンスによって得られた16SrDNA配列情報をも とにした菌叢解析および統計解析には CLC Genomic WorkBench (Filgen) を用いた. iSeq によって得られ たペアエンドリードのうち50%以上がマージできな かったために、ペアエンドの fastq ファイルのうちの リード1(約150bp)を用いて解析を行った.ソフトウ エアーにインポートしたシーケンスデータは Trimming Sequences ツールにより長さとクオリティースコア,未 決定塩基の出現回数に基づきトリミングした. トリミン グパラメーターとして, Trim using quality score の閾値 を 0.05 に, Trim ambiguous nucleotides の最大不確定塩 基数を1に設定した. トリミング後の配列長の長さを最 短140bp, 最長270bpとした. トリミング後のリード に対してゼブラフィッシュゲノムのリファレンスゲノム データーと一致する配列を Clean Host DNA ツールを用 いて取り除いた. 続いて実験条件ごとに配列情報を分類 するため、サンプル名、曝露実験時の水温、傷の有無、 病原菌曝露の有無、サンプル回収時のゼブラフィッシュ の生死と飼育水との分類に基づくメタデータを作成し た. 最終的に得られた 16S rDNA リード(20000-1500 リード)をOTU Clustering ツールを用いてOTU (operational taxonomic unit) ごとに分類分けした. リファレ ンスデータベースに基づくOTU クラスタリングを行 い,リファレンスのデータベースとして GreenGene を 用い,類似度 97%を閾値とした.得られたテーブルデー タを Microsoft Excel 形式のデータとしてエクスポート し,総リード数,OTU 数,サンプル間で重複するOTU の個数,各OTU が占める割合を計算した.さらに詳細 な細菌種の同定には得られたリード配列を NCBI Blast にて検索することで行った.

各実験群における OTU の存在量に基づくヒートマッ プの作成は Create Heat Map for Abundance Table ツー ルによりおこなった.上記の OTU Clustering ツールに よって比較したい実験群のシーケンスデータより Abundance Table を作成し,これをもとにツールを実行 した.パラメータとしてサンプル間距離の計算方法とし てユークリッド距離を用い,クラスタリングの方法とし て完全連結法を選択した.サンプル間のユークリッド距 離(E)の計算は以下の式による.

$$\mathbf{E} = \sum_{i=1}^n \sqrt{(X_i^A - X_i^B)^2}$$

ここで*n*はOTUの数, $X_i^A \ge X_i^B$ はOTU*i*のサンプルA およびBにおける abundance である.

実験条件間での各 OTUの変化量の計算と,有意差の 検定は Differential Abundance Analysis ツールを用いて 解析した. 比較したい実験群のシーケンスデータより Abundance Table を作成し,それをもとにしてツールを 実行した. 比較方法としてコントロールに対する比較を 選択し,コントロール群となる条件を選択した. 得られ たテーブルを Microsoft Excel で読み込めるファイル形 式にエクスポートし,倍率変化, p値および FDR 補正 p 値から volcano プロットを作成した.

実験群間のβ多様性解析は次のように行った.比較対 象の実験群のシーケンスデータよりAbundance Table を 作成し, Align OTUs with MUSCLE ツールにより OTU に分類分けされたリードをアラインメントした. このア ラインメントデータをもとに Create tree ツールにより 系統樹を作成した.系統樹の作成方法として近隣結合法 をもちい,核酸配列のアラインメントデータに基づく距 離の測定方法として K80 モデル (Kimura, 1980)を用 いた.作成された系統樹から Beta diversity ツールを用 いて,各サンプル間の Unweighted Unifrac 距離および Weighted Unifrac 距離 (Lozupone *et al.*, 2011)を計算し, このデータから3次元主座標プロット (3D PCoA plot) を作成した.

それぞれのUniFrac距離の計算は以下の式による.

Unweighted UniFrac:

$$d(U) = \frac{\sum_{i=1}^{n} b_i \left| i(p_i^A > 0) - i(p_i^B > 0) \right|}{\sum_{i=1}^{n} b_i}$$

Weighted UniFrac:

$$d(w) = \frac{\sum_{i=1}^{n} b_i \left| p_i^A - p_i^B \right|}{\sum_{i=1}^{n} b_i \left(p_i^A + p_i^B \right)}$$

ここで*n*は系統樹の枝数. p_i^A , p_i^B はそれぞれサンプル AおよびB中の枝*i*に帰属する分類群の個体数. 指示関数*i*($p_i^A > 0$), *i*($p_i^B > 0$)はそれぞれサンプルAおよびB中の枝*i*に属する分類群の個体数が0以上の時は1, それ以外の時は0となる.

サンプル間の群集性の判定および群集間の有意差検定 に は PERMANOVA (PERmutational Multivariate ANalysis Of VAriance) ツールを利用した. β多様性解 析に用いた系統樹を用いてサンプル間のUnweighted Unifrac 距離およびWeighted Unifrac 距離を計算させた. 順列 (Number of permutations) は 99, 999 にセットした. 統計値の計算はAnderson (2001)の方法により算出した.

養殖魚の表皮細菌叢の取得

石井養殖(岐阜県大垣市)で養殖しているニジマス (Oncorhynchus mykiss)(8か月齢および1年2か月齢) を使用した.細菌叢の回収は麻酔を使用せずに,表皮全 体を滅菌綿棒で擦り取り,滅菌した飼育水に浸してボル テックスで懸濁した.また飼育場の水も採取し,フィル ターで吸引濾過して微生物を回収した.

結果と考察

Y. ruckeriの経皮感染条件の検討

Y. ruckeri がモデル魚類となるゼブラフィッシュに対 して経皮感染を引き起こす条件を模索した. Fig.1は2 種類の飼育水温と表皮の傷の有無により実験群を構成 し,病原菌を暴露した後の生存個体の数の推移を示した グラフである. ゼブラフィッシュの飼育至適水温である 28℃で病原菌に暴露したところ,暴露後すべての個体 が生存した. 次に,水温は至適水温のままで,表皮に傷 をつけたのち,病原菌を暴露した. この場合も傷をつけ ない場合と同様にほぼすべての個体が生存した. これら のことからゼブラフィッシュの至適水温である 28℃で は Y. ruckeri はゼブラフィッシュに感染しないことが示 された. 次に病原菌を暴露する水温を 20℃まで引き下 げ実験を行った. 傷をつけずに病原菌暴露を行った場合 は 28℃の時と同様にほとんどの個体が生存した. 一方



Fig. 1 The number of survival fishes in infection experiments after pathogen challenge. The number of survival fishes in each experimental condition was counted for 7 days after the challenge of *Y. ruckeri*. Non-infection group (without pathogen) and infection group (with pathogen) were compared in each experimental condition. Inset image are the dead fishes after the challenge of *Y. ruckeri*.

で、傷をつけたのち、病原菌を暴露した場合はほとんど の個体が暴露後7日目以内に斃死した(Fig.1). 斃死し た個体は鰓付近より出血がみられ、レッドマウス病様の 症状を呈していた (Fig.1 inset image). 20℃で傷をつ けた条件のうち、病原菌を暴露しない非感染群の個体は ほぼすべての個体が生存したことから、ゼブラフィッ シュはY. ruckeriの感染により斃死したものと考えられ た.また、表皮に傷をつけない条件では感染群の個体も ほぼ生存したことから(Fig.1),表皮の傷が感染の原 因となっていることが示唆された. 魚類は変温動物であ り、水温によって個体の抗体生産能などの免疫機構が影 響されることが知られている (Bly & Clem, 1992; Le Morvan-Rocher et al., 1995; Nikoskelainen et al., 2004). したがって飼育水温を下げたことで、ゼブラフィッシュ の免疫機構が影響を受け、至適水温の時と比べ免疫力が 低下し、Y. ruckeriに感染しやすくなった可能性がある. 魚の表皮は病原菌の侵入を防ぐためのバリアとして機能 を有していると考えられ、表皮に分泌される皮膚粘液中 にはレクチンなどの生体防御因子が含まれている (Nakamura et al., 2001; Tsutsui et al., 2005; Gomez et al., 2013; Unajak et al., 2015; Brinchmann, 2016; Tsutsui et al., 2016). 表皮に傷をつけた魚は病原菌存在下での生存率 が低下することが報告されている (Liu et al., 2015). し たがって、傷をつけたことでバリア機能が破壊され病原 菌が体内に侵入しやすい状況が生まれたほか、生理的な ストレスによって、生体防御因子の分泌低下など免疫活 性が低下し、普段は感染しない病原菌に感染しやすい状 態になったと考えられる.

Y. ruckeri 経皮感染実験における主要な表皮細菌叢の構成の変化

感染を引き起こすようなストレスを与えた状態で、表 皮の微生物フローラがどのような影響を受けるのかを観 察するために、主な微生物フローラとして細菌叢に注目 し解析を行った. 飼育水温28℃および20℃の各実験群 より採取した表皮サンプルよりそれぞれ138339 リード および 263519 リードの細菌由来 16S rDNA 配列のシー ケンスが得られた. これらの配列をリファレンスデータ ベースと照合し operational taxonomic unit (OTU) ごとに 分類することで、28℃のサンプルからは285、20℃のサン プルからは484のOTUに分類された.傷の付加や病原菌 暴露を行わずに, 飼育温度を変化させただけで飼育した個 体の細菌叢解析の結果, 28℃では主に Enterobacteriacea 科 (31.2%), Acinetobacter 属 (17.6%), Methylobacterium 属 (6.6%), Bosea 属 (5.3%), Delftia 属 (4.2%) Stenotrophomonas 属 (3.3%), Pseudomonas 属 (1.5%), *Ochrobactrum* 属 (1.2%) が, 20°C では *Pseudomonas* 属

(31.6%), Sphingobacteriales \exists (14.1%), Acinetobacter 属 (10.4%), Yersinia 属 (5.8%), Pedobacter 属 (3.9%) Aeromonas $\mathbf{g}(2.2\%)$, Propionibacterium $\mathbf{g}(2.0\%)$ O 占有率が高かった(Fig.2A). また, 28℃および20℃ で特異的にみられた OTU はそれぞれ 148,347,両方に 共通してみられたOTUは137であった. 20℃および 28℃で存在比率の高い細菌種の変遷を比較したところ, どちらの温度でも共通してみられる OTU にそのほとん どが属し、温度により占有率の交替がおこることにより 細菌叢の構成変化を引き起こしていることが示唆された (Fig.2B). 次に, 傷をつけたことによる影響を観察す るために、各飼育水温において、病原菌を暴露しなかっ た非感染群で、傷をつけた個体と付けなかった個体の主 要な細菌叢の変化を比較した.28℃の飼育水温におい ては Cerasicoccaceae 科, Acidovorax 属, Bosea 属の割合 が増加し, Stenotrophomonas 属の割合が減少していた. 一方20℃では、傷をつけたことによる主要な細菌叢の 占有率の変化は小さかった(Fig.2A).次に、病原菌暴 露の影響を観察するために, 各飼育温度において, 病原 菌を暴露した感染群と、何もせずに飼育したコントロー ル群を比較した.28℃では傷をつけずに病原菌を暴露し た場合は Cerasicoccaceae 科が増加し、Stenotrophomonas 属の割合が減少していた(Fig.2A).病原菌を暴露する とともに表皮に傷をつけた場合は, Luteolibacter 属の増 加と, 傷の付加で増加していた Acidovorax 属の割合が さらに顕著に増加した.20℃の水温においては、傷を つけない感染群では主要な細菌群の占有率については大 きな変化が見られなかった(Fig.2A).一方で傷をつけ て病原菌を暴露した場合は多くの魚が斃死し、斃死魚の 細菌叢は病原菌として暴露した Yersinia 属が 80% 以上を 占有していたことから、感染が経皮的に起こったとこと が明らかとなった (Fig.2A).

感染実験で用いた飼育水中では病原菌の割合は低いこ とから(Fig.2A), Y. ruckeri は固体表面に付着したこと が示唆される. Y. ruckeri は固体表面上にバイオフィルム を形成することが知られ,そのようなバイオフィルムが 感染源になると考えられている(Kumar et al., 2015). 一方,感染し斃死した魚の表皮細菌叢が Yersinia 属細菌 に占有されていたことから,今回の実験条件では魚の表 皮上に直接バイオフィルムを形成したことが示唆された.

28℃から20℃への温度変化では主要な細菌叢の構成 が大幅に変化していることが示された(Fig.2B).また, 温度変化による主要細菌叢の交替は,新たな種が表皮を 占有したというよりは、もともとどちらの温度でも表皮 に存在した細菌の表皮占有率が増減したことによるもの であることが示唆された(Fig.2B).表皮は水温の影響



В



Fig. 2 Bacterial composition on individual fish skin in infection experiments. (A) The stacked bar chart shows the abundance of Operational Taxonomic Unit (OTU) (top 50) in fish skin samples. The samples were grouped by water temperature (20°C or 28°C), the status of injury (Injury + or -), and the status of the pathogen challenge (*Y. ruckeri* + or -). (B) Comparison of the abundance of the major skin bacteria varied by water temperature. The stacked area chart shows the abundance of respective bacteria from fish skin maintained at 28°C and 20°C. The data from fishes in the uninjured, non-infection group (Injury - *Y. ruckeri* -) were used for the analysis.

を受けやすいことから、そこに形成されている細菌叢も 水温に影響されると考えられ、細菌種によって異なる生 育至適温度が占有率の変化に影響した可能性が高いと考 えられる.水温低下や傷の付加といったストレスによる 免疫力の低下に加え、温度変化による表皮細菌叢の変化 よって Y. ruckeri が表皮上にバイオフィルムを形成しや すい状態になった可能性がある.28℃においては傷の 付加や病原菌暴露といったストレスによりAcidovorax 属やLuteolibacter 属細菌の占有率がそれぞれ増加したが (Fig.2A),これらの細菌種が魚に対する病原性を示す という報告は見られない.一方でAcidovorax 属に関し ては20℃に飼育水温を低下させた場合にも占有率がや や増加していることから(Fig.2A)、ゼブラフィッシュ においてストレスを与えると表皮において占有率が増加 する細菌種である可能性がある.

Y. ruckeri 経皮感染実験における各 OTU の量的変化

20℃および28℃で感染実験を行った各実験群の魚の うちの生存個体について、100リード以上存在する各 OTUのリード当たりの存在量を個体ごとにヒートマッ プで示し、各OTUの存在パターンによりクラスタリン グした.その結果、20℃と28℃の実験群に属する個体 はそれぞれ別のクラスターに分離した (Fig.3). 20℃で 存在量が多いOTUに関して20℃で大きく占有率が上昇 した主要細菌群 (Fig.2B)のほか病原性細菌や寄生性細 菌をふくむ OTU が増加している傾向がみられた (Fig.3). 主 な OTUと し て は Rickettsiales 目 Cytophagaceae 科 Aeromonas 属 (Janda & Abbott, 2010), Chryseobacterium 属 (Zamora et al., 2012), Flavobacterium 属 (Loch & Faisal, 2015), Janthinobacterium 属 (Austin et al., 1992), Stenotrophomonas 属 (Abraham et al., 2016), Yersinia 属 (Kumar et al., 2015), Acinetobacter johnsonii (Kozińska et al., 2014) がみられ, Stenotrophomonas 属とA. john*sonii* 以外は 20℃での飼育により増加していた (Fig.3).

28℃と20℃のそれぞれの実験群において,傷の付加 や病原菌暴露といったストレスを与えた実験群と温度変 化以外には何もストレスを与えなかったコントロールの 実験群を比較した場合の各OTUの存在量の変化を volcanoプロットによって表示した(Fig.4).その結果, 28℃での感染実験群では有意に増加,減少の傾向を示 すOTUが同時にみられたのに対し,20℃では病原菌暴露 や傷の付加により特定のOTUの存在量が有意に減少する 傾向を示した.傷の付加により,有意に増加している3 つのOTUはA. johnsonii, Pseudomonas 属 Zoogloea 属で あった.一方,病原菌暴露および傷の付加により有意に 減少しているOTUは Cytophagaceae 科, Methylobacteriacea 科, Neisseriaceae 科, Rhizobiaceae 科, Burkholderia 属, Corynebacterium 属, Delftia 属, Propionibacterium 属, Staphylococcus 属, Stenotrophomonas 属, Acidovorax soli であった.

次に、このような変化が20℃の各実験群の個体の細 菌叢全体に与える影響を解析するために、20℃で斃死 した実験群と飼育水のサンプルを除く実験群に対して, Unifrac 距離(Lozupone *et al.*, 2011)を用いたβ多様性 解析を行い,各実験群間の細菌叢の類似性を観測した (Fig.5). また PERMANOVA 解析 (Anderson, 2001) による類似度検定を行い, β多様性解析の結果の相違が 有意なものかを検定した(Table 1). β多様性解析の結 果を主座標分析により視覚化したものを Fig.5 に示し た. 各個体間について OTU を構成するメンバーの有無 のみ考慮に入れた Unweighted UniFrac 距離を計算した 場合は、傷の付加や病原菌の暴露によるそれぞれの実験 群の細菌叢の相違は少なかった.一方でそれぞれの OTUの存在量(リード数)を考慮した Weighted Unifrac 距離を計算した場合は、病原菌を暴露したグループと暴 露していない群集に分かれた. PERMANOVA 解析の結 果, Unweighted Unifrac 解析による β多様性比較では傷 の有無による各個体の群集性は低く (pseudo-F 値 1.38). 傷の有無により形成された各個体群集間での優位な差は 見られなかった.一方で病原菌暴露の有無では弱いなが ら条件の違いによる群集形成がみられ (pseudo-F 値 2.70), それらの群集間多様性に優位な差がみられた(P 値<0.04). 一方で, Weighted Unifrac 解析を用いた β多 様性比較では、傷の有無により各個体の群集性がみられ (pseudo-F 値 3.45). 傷の有無により形成された各個体 群集間で多様性に優位な差がみられた(P値<0.03). さらに病原菌暴露の有無ではより顕著な群集形成がみら れ (pseudo-F 値 3.88), 群集間で多様性に優位な差がみ られた(P値<0.02)(Table 1). これらの結果から, 20℃における傷の付加および病原菌の暴露について、 どちらも細菌叢の構成全体に影響を与えていること、傷 の付加よりも病原菌の暴露の方が、表皮細菌叢の構成に 与える影響が大きいこと、その影響は構成メンバーへの 影響といった定性的なものよりも、メンバーの量的な変 化への影響が大きいということが示唆された.

先に述べたように魚の免疫機能は水温に影響される. 20℃では病原性細菌や寄生性細菌を含むOTUの増加が みられたが(Fig.3),20℃という水温はゼブラフィッ シュにとっての至適温度である28℃から大きく外れる 為,免疫機能の低下がおこり,日和見感染している病原 性細菌や寄生性細菌を含むOTUの増加がみられたので はないかと推定される.

20℃では傷の付加や病原菌の暴露によって細菌叢の 量的な減少を伴う変化が主にみられたが、28℃では細





- 39 -



Fig. 4 Volcano plot showing the degree of differential abundance of bacteria on the fish skin in infection experiments at 28°C and 20°C. Log₂-transformed fold change in abundance against control group (Injury-, *Y. ruckeri* -) is plotted on the x-axis and log₁₀-transformed false discovery rate-adjusted p-values plotted on the y-axis. The dashed horizontal line represents the 0.1 p-value cutoff.

菌量の増加と減少が共にみられた(Fig.4). これは 20℃で形成されている細菌叢は28℃のものとは質的に 変化しており、傷の付加や Y. ruckeriの暴露によって、 細菌叢の構成メンバーが生育阳害を受けやすくなってい る可能性を示している. 細菌量の減少により空いた場所 には Y. ruckeri がバイオフィルムを形成する可能性が考 えられる。一方で、水温低下と共に傷を与えなければ Y. ruckeriの表皮占有率の上昇および斃死に至らないこと から、傷の付加と同時に病原菌を暴露したことにより、 より大きな表皮細菌叢の変化が起き、付着したY. ruckeriの表皮上での増殖が促されたのではないかと推 測される. また, 傷をつけた場合にはA. johnsoniiのよ うな魚類にとって病原性を示す可能性がある細菌が増加 していたことから. 傷の付加は一部の病原性細菌の増殖 を促す可能性がある.本研究では20℃で傷を付加した 後に、病原菌を暴露した個体はほとんどが斃死したため、 傷の付加と病原菌暴露による相加的・相乗的な細菌叢へ

Table 1 PERMANOVA analysis for β-diversity.

の影響は解析できなかったが、唯一生き残った個体の細

Distance metric	Group 1	Group 2	Pseudo-f statistic	p-value
Unweighted UniFrac	Y.ruckeri -	Y.ruckeri +	2.70	0.04
	Injury -	Injury +	1.38	0.23
Weighted UniFrac	Y.ruckeri -	Y.ruckeri +	3.88	0.02
	Injury -	Injury +	3.45	0.03



Fig. 5 Principal coordinate analysis (PCoA) of beta diversity of fish skin bacterial floras in infection experiments at 20°C. Unweighted or weighted UniFrac distances were analyzed among the samples from alive fish at 20°C and plotted by PCoA. Dashed circle represents the group of samples from the fish challenged with *Y. ruckeri*.

菌叢の構成や他の斃死個体の細菌叢の構成(Fig.2A) から推測すると、主要細菌叢間の存在比には変化がない 傾向がみられることから、主要細菌叢以外の変化が引き 金になり、Y. ruckeriの表皮占有が引き起こされたので はないかと思われる。

これらのことから,20℃に水温を変化させることで, 表皮細菌叢が変化し,それによって細菌叢が質的に変化 することで,表皮細菌叢のY. ruckeriに対する抵抗性が 低下したことに加え,低温と傷の付加によってゼブラ フィッシュ個体の免疫力低下したことにより,病原菌に 対する感受性が増したのではないかと推測される.

Y. ruckeriの表皮占有における表皮細菌叢破壊の影響 20℃における経皮感染で観察された Y. ruckeriの表皮 占有について、表皮細菌叢との関係を調べるために、抗 生物質処理により細菌叢を破壊したゼブラフィッシュに ついて Y. ruckeriの感染実験を行った。20℃で抗生物質 処理に供した魚は感染群、非感染群ともにほとんど斃死 しなかった(Fig.6A).これらの魚の表皮細菌叢を解析 したところ、20℃で抗生物質を24時間投与したのち、 水を入れ替え飼育を継続した魚の細菌叢は処理をせずに 飼育した魚(Fig.2A)と比較して異なる構成を示した (Fig.6B).このことは、抗生物質処理により細菌叢が 破壊され、再構成されたことを示唆している.さらに、 抗生物質処理後に Y. ruckeri を暴露した場合、Y. ruckeri の表皮占有がみられた(Fig.6B).

Fig.1の感染実験では斃死した魚を中心に Y. ruckeriの 表皮占有が観察されたが、今回の実験条件では斃死して



Fig. 6 Infection experiments with zebrafish treated with antibiotics. (A) The skin bacterial flora was destroyed by antibiotics treatment, and then the number of survival fish was counted for 7 days after the challenge of *Y. ruckeri*. Non-infection group (without pathogen) and infection group (with pathogen) were compared. (B) The stacked bar chart showing abundance of OTU (top 50) in antibiotics-treated fish skin samples at a genus level. The samples were grouped by the status of the pathogen challenge (*Y. ruckeri* + or –).

いない魚でも表皮に Y. ruckeri が多く見られた. このこ とから, Y. ruckeri による表皮の占有は表皮細菌叢を破壊 することで魚の生死に関係なく起こることが示された. このことから,表皮細菌叢の構成の変化は Y. ruckeri の 表皮付着を左右することが示唆された. 魚類のウイルス の感染について,表皮細菌叢の破壊が感染を引き起こす という報告例があるが (Reid et al., 2017),細菌の経皮 感染についても表皮細菌叢の構成が重要な要因となるこ とが示唆された.

養殖魚における表皮細菌叢の変遷

ゼブラフィッシュでは Y. ruckeriの経皮感染が成立す る20℃と成立しない28℃で細菌叢の構成が異なってい た. また. 20℃では病原菌の暴露により表皮細菌叢の 量的な変化が観察された. このようなストレスによる表 皮細菌叢の変動は Y. ruckeriの感染を左右する可能性が 高いが、実験条件とは異なり、特別なストレスを与える 状態ではない養殖の現場でも生育環境の変化により表皮 細菌叢の構成が変動しているのかは不明である.そこで、 Y. ruckeri に自然感染することが知られているニジマス について, 生育段階と飼育水の条件が異なる魚から表皮 細菌叢を採取し解析を行った. ニジマスの成魚の表皮細 菌叢の菌叢解析の結果、合計 77586 リードのシーケンス データから 2752 の OTU に分類された. 実験室環境で飼 育しているゼブラフィッシュ表皮細菌叢とは異なり多様な 種からなる細菌叢が観察された. 主な細菌種は, Massilia 属 (17%), Sphingomonas 属 (10%), Deinococcus 属 (7%). *Flavobacterium* 属 (3%). *Gemmatirosa* 属 (3%). Roseomonas \mathbf{k} (3%), Tychonema \mathbf{k} (3%), Hymenobacter 属 (2%), Aliterella 属 (2%) であった (Fig.7). 同じ養 殖場から採取した8か月齢と1年2か月齢のニジマスの 表皮細菌叢では Massilia 属, Tychonema 属, Spirosoma 属, Scytonema 属, Cutibacterium 属, Calothrix 属などが生育 段階で異なる占有率を示していた(Fig.7).同一の養 殖場の異なる月齢(1年2か月齢と8か月齢)のニジマ スおよびその飼育水の細菌叢について、リード数が100 以上のOTUに関してヒートマップを作製したところ, それぞれが異なるプロファイルを示した (Fig.8). ま た8か月齢の魚の表皮細菌叢の一部は飼育水の細菌叢の 影響を受けていることが示唆された (Fig.8). これら のことから、魚の生育段階や、養殖池の水の違いにより 養殖場のニジマス表皮細菌叢が容易に変化することが示 唆された. 遺伝的に隔絶された環境に生育するサーモン の個体群間では表皮細菌叢が異なることが報告されてい るが (Uren Webster et al., 2018), 養殖魚の表皮細菌叢 についての関連する報告として、輸送や網による捕獲と いった魚の取り扱いによっても細菌叢が変化するという



Fig. 7 Analysis of the skin bacterial floras of rainbow trout from a fish farm. Skin bacterial flora of rainbow trout was collected from the 1 year 8 monthes (1y8m) and 8 monthes (8m) old fishes, and the composition was analyzed by NGS. The abundance of the major skin bacteria was compared between 1 year 8 months and 8 months fishes by a stacked area chart. Closed and open triangles represent the bacteria that abundantly exist on 8 months or 1 year 8 months old fish, respectively.

報告もあり(Minniti et al., 2017),同じ養殖場の池の違いや、生育段階の違いといったより狭いレベルでも、表 皮細菌叢は影響を受けるものと考えられる.表皮細菌叢 が変化すれば Y. ruckeriのような病原性細菌に対する感 受性も同時に養殖の各段階で変化している可能性がある.

要 約

水産養殖の生産性の向上のために魚病対策の重要性が 増している.本研究では適応範囲が広く簡便な魚病対策 の新手法として「魚類表皮版プロバイオティクス」を掲 げ,その実現可能性を探ることを目的とした.

ゼブラフィッシュをモデル魚類とし、温度変化と傷に よるストレスや、抗生物質の投与による表皮細菌叢の破 壊を行った後、病原菌(Yersinia ruckeri)を暴露し、経 皮感染が進行するか観察した.また、その際の表皮細菌 叢の変化を次世代シーケンサー(NGS)による16S rDNA アンプリコンの網羅的シーケンスによって解析した.

感染実験において, 飼育水温を20℃に下げ, さらに 表皮に傷をつけた後, 病原菌を暴露したところ, 斃死す

魚類体表微生物叢の網羅的解析と感染予防効果の検討



Fig. 8 Clustered heatmap of the skin bacterial flora of rainbow trout and their breeding water. The relative abundances of the identified OTUs (over 100 reads) in individual fish skin samples and breeding water were shown by heatmap. Samples were clustered by the pattern of OTU abundance and taxonomy. Solid frame border represents specific bacteria that exist in 1-year 2-moth or 8-month old fish. Dashed frame border represents OTUs that exist both 8-month old fish and its breeding water. る個体が観察された. 斃死個体と生存個体の表皮細菌叢 を比較したところ、斃死個体の表皮細菌叢は病原菌に占 有されていることが明らかとなった.このことから,病 原菌が表皮に付着し、感染したことが示唆された、この 時の表皮細菌叢と病原菌感染の関係を調べるため, 28℃と20℃の表皮細菌叢を比較した. その結果, 20℃ では主要細菌叢の交替と、病原性、寄生性細菌を含む OTUの増加がみられた. このことは、飼育水温の低下 により、ゼブラフィッシュの免疫系が影響を受けたこと を示唆していた.次に20℃および28℃での各感染条件 において OTU レベルでの細菌叢の比較を行った. その 結果、20℃ではコントロール群と比較して、病原菌の 暴露や傷の付加によって特定のOTUが減少する傾向が みられた. 20℃で斃死した条件を除く感染実験の各条 件において,傷の付加や病原菌暴露が表皮細菌叢全体に もたらす影響をβ多様性解析によって観測したところ. 主として病原菌暴露により細菌叢の量的変化を伴う影響 がもたらされていることが示唆された.表皮細菌叢と病 原菌の感染との関係を調べるために、抗生物質処理によ り表皮細菌叢を破壊した個体に病原菌を暴露する感染実 験を行った、抗生物質処理後の病原菌の暴露によりほと んどの魚は生存したが、表皮細菌叢は病原菌に占有され ていた.これらの結果から、ゼブラフィッシュ表皮細菌 叢が病原菌の表皮への付着を防いでいること, 魚に与え たストレスにより表皮細菌叢や魚の免疫系が影響を受 け、病原菌に対する感受性が高まることが示唆された. さらに、養殖場での表皮細菌叢の変遷を観察するために、 Y. ruckeri に自然感染することが知られているニジマス の表皮細菌叢を解析した. その結果, 同じ養殖場内で飼 育されている個体間でも飼育水や生育段階により表皮細 菌叢は変化していた. これらのことから, 養殖魚につい ても養殖の過程での表皮細菌叢の変化が Y. ruckeriの感 染感受性に影響する可能性を見出した.

本助成で得られた研究成果の報告

(1)

Hori, K., Nakatani, H., Arakawa, T., Okazaki, F. & Tamaru, Y. 2019 Analysis of epidermal bacterial flora of fish: Basic knowledge for probiotics. Joint Conference of the 12th International Marine Biotechnology Conference and the 12th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference, Sep.9-13, Shizuoka, Japan

(2)

Nakatani, H., Tsukamoto, Y., Yamada, N., Arakawa, T & Hori, K. 2019 Analysis of the skin bacterial flora of trout in fish farm. Joint Conference of the 12th International

Marine Biotechnology Conference and the 12th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference, Sep.9-13, Shizuoka, Japan

保存機関に寄託した菌株

特願 2019-106436, 発明者: 堀 克敏, 出願人: 名古屋大学, 発明の名称:「魚類表皮プロバイオティクスに有用な微 生物」

Pseudomonas sp. KH-ZF1株 保存機関 独立行政法人製品 評価技術基盤機構 機関番号 9011005001123

謝 辞

本研究の遂行にあたり,助成いただきました公益財団 法人発酵研究所に深く感謝いたします.本研究の遂行に 協力いただいた全国養鱒振興協会会長理事 小堀 彰彦 氏,石井養殖石井 優二氏,名古屋大学工学研究科 荒川 友子氏,オスロ大学 Dirk Linke 教授に深く御礼申し上 げます.

参考文献

- Abraham, T. J., Paul, P., Adikesavalu, H., Patra, A. & Banerjee, S. 2016. *Stenotrophomonas maltophilia* as an opportunistic pathogen in cultured African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Aquaculture 450: 168-172.
- Anderson, M. J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecol. **26**: 32-46.
- Austin, B., Gonzalez, C. J., Stobie, M., Curry, J. I. & McLoughlin, M. F 1992. Recovery of *Janthinobacterium lividum* from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northern Ireland and Scotland. J. Fish Dis. 15: 357-359.
- Bly, J. E. & Clem, L. W. 1992. Temperature and teleost immune functions. Fish Shellfish Immunol. 2: 159-171.
- Boutin, S., Sauvage, C., Bernatchez, L., Audet, C. & Derome, N. 2014. Inter individual variations of the fish skin microbiota: host genetics basis of mutualism? PLoS One. 9: e102649.
- Brinchmann, M. F. 2016. Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using -omics technologies. Mol. Biosyst. 12: 2056-2063.
- Cantas, L., Shah, S. Q., Cavaco, L. M., Manaia, C. M., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Burgmann, H. & Sorum, H. 2013. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. Front. Microbiol. 4: 96.
- FAO 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 -Meeting the sustainable development goals. *In* M. Barange, J. Alder, U. Barg, S. Funge-Smith, P. Mannini, M. Taconet & J. Plummer (eds.), The State of World series, the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roam.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture **180**: 147-165.

- Giatsis, C., Sipkema, D., Ramiro-Garcia, J., Bacanu, G. M., Abernathy, J., Verreth, J., Smidt H. & Verdegem, M. 2016. Probiotic legacy effects on gut microbial assembly in tilapia larvae. Sci. Rep. 6: 33965.
- Gomez, D., Sunyer, J. O. & Salinas, I. 2013. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. Fish Shellfish Immunol. 35: 1729-1739.
- Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., Wang, A. & Zhou, Z. 2018. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. Front. Microbiol. 9: 2429.
- Irianto, A. & Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture. J. Fish Dis. **25**: 633-642.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. 2010. The Genus Aeromonas: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. Clin. Microbiol. Rev. 23: 35.
- Kelly, R. & Davies, S. C. 2017. Tackling antimicrobial resistance globally. Med. J. Aust. 207: 371-373.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111-120.
- Kozińska, A., Paździor, E., Pękala, A. & Niemczuk, W. 2014. Acinetobacter johnsonii and Acinetobacter lwoffii - the emerging fish pathogens. B. VET. I. PULAWY 58: 193-199.
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M. & El-Matbouli, M. 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. Vet. Res. **46**: 103.
- Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S. A. & Arias, C. R. 2013. Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. FEMS Microbiol. Ecol. 85: 483-494.
- Le Morvan-Rocher, Troutaud, C., D. & Deschaux, P. 1995. Effects of temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and nonspecific cytotoxic activity. Dev. Comp. Immunol. 19: 87-95.
- Leung, T. L. F. & Bates, A. E. 2013. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security. J. Appl. Ecol. 50: 215-222.
- Liu, X., Wu, H., Liu, Q., Wang, Q., Xiao, J. & Zhang, Y. 2015. Skininjured zebrafish, *Danio rerio*, are more susceptible to *Vibrio* anguillarum Infection. J. World Aquac. Soc. 46: 301-310.
- Loch, T. P. & Faisal, M. 2015. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. J. Adv. Res. 6: 283-300.
- Lozupone, C., M. E. Lladser, D. Knights, J. Stombaugh & R. Knight 2011. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. ISME. J. 5: 169-172.
- Minniti, G., Hagen, L. H., Porcellato, D., Jørgensen, S. M., Pope, P. B. & Vaaje-Kolstad, G. 2017. The skin-mucus microbial community of farmed atlantic salmon (*Salmo salar*). Front. Microbiol. 8: 2043-2043.
- Nakamura, O., Watanabe, T., Kamiya, H. & Muramoto, K. 2001. Galectin containing cells in the skin and mucosal tissues in Japanese conger eel, *Conger myriaster*: an immunohistochem-

ical study. Dev. Comp. Immunol. 25: 431-437.

- Nikoskelainen, S., Bylund, G. & Lilius, E. M. 2004. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. Dev. Comp. Immunol. 28: 581-592.
- Peatman, E., Li, C., Peterson, B. C., Straus, D. L., Farmer, B. D. & Beck, B. H. 2013. Basal polarization of the mucosal compartment in *Flavobacterium columnare* susceptible and resistant channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Mol. Immunol. 56: 317-327.
- Reid, K. M., Patel, S., Robinson, A. J., Bu, L., Jarungsriapisit, J., Moore, L. J.& Salinas, I. 2017. Salmonid alphavirus infection causes skin dysbiosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) postsmolts. PLOS ONE 12: e0172856.
- Shreiner, A. B., Kao, J. Y. & Young, V. B. 2015. The gut microbiome in health and in disease. Curr. Opin. Gastroenterol. 31: 69-75.
- Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E. & Frost, P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. Expert. Rev. Vaccines 4: 89-101.
- Sylvain, F. E., Cheaib, B., Llewellyn, M., Gabriel Correia, T., Barros Fagundes, D., Luis Val, A., & Derome, N. 2016. pH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). Sci. Rep. 6: 32032.
- Tsutsui, S., Tasumi, S., Suetake, H., Kikuchi, K. & Suzuki, Y. 2005. Demonstration of the mucosal lectins in the epithelial cells of internal and external body surface tissues in pufferfish (*Fugu rubripes*). Dev. Comp. Immunol. **29**: 243-253.
- Tsutsui, S., Yoshinaga, T., Komiya, K., Yamashita, H. & Nakamura, O. 2016. Differential expression of skin mucus C-type lectin in two freshwater eel species, *Anguilla marmorata* and *Anguilla japonica*. Dev. Comp. Immunol. **61**: 154-160.
- Unajak, S., Pholmanee, N., Songtawee, N., Srikulnath, K., Srisapoome, P., Kiataramkul, A., Kondo, H., Hirono, I. & Areechon, N. 2015. Molecular characterization of Galectin-8 from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) and its response to bacterial infection. Mol. Immunol. 68: 585-596.
- Uren Webster, T. M., Consuegra, S., Hitchings, M. & Garcia de Leaniz, C. 2018. Interpopulation variation in the atlantic salmon microbiome reflects environmental and genetic diversity. Appl. Environ. Microbiol. 84: AEM.00691-00618
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. & Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 655-671.
- Zamora, L., Vela, A. I., Palacios, M. A., Domínguez, L. & Fernández-Garayzábal, J. F. 2012. First isolation and characterization of *Chryseobacterium shigense* from rainbow trout. BMC Vet. Res. 8: 77.
- Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K. & Lazado, C. C. 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. Vet. Q. 36: 228-241.

酸素発生型光合成により駆動する嫌気発酵プロセス 得 平 茂 樹

首都大学東京大学院理工学研究科 〒192-0397東京都八王子市南大沢1-1

Anaerobic fermentation driven by oxygen-evolving photosynthesis Shigeki Ehira

Graduate School of Science and Technology, Tokyo Metropolitan University 1-1 Minami-Osawa, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan

Cyanobacteria, which carry out oxygen-evolving photosynthesis, have attracted attention as hosts for the direct production of biofuels and valuable chemicals from CO_2 using light energy. Various chemical-producing strains have been generated by introducing engineered metabolic pathways. However, the introduced metabolic pathways often include oxygen-sensitive enzymes, which are inactivated by oxygen evolved during photosynthesis. *Anabaena* sp. strain PCC 7120 is a filamentous cyanobacterium that forms differentiated cells called heterocysts with a semi-regular spacing of 10 to 15 cells along filaments. Heterocysts are specialized for nitrogen fixation, and their intracellular environment is maintained micro-oxic to protect oxygen-sensitive nitrogenase, an enzyme for nitrogen fixation. This study aimed to utilize the heterocyst as a host for the production of chemicals with oxygen-sensitive enzymes under photosynthetic conditions. A genetically engineered strain, expressing within heterocysts the 1-butanol synthetic pathway that includes a highly oxygen-sensitive Bcd/EtfAB complex from the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*, was generated. In this strain, 1-butanol production was concomitant with oxygen-evolving photosynthesis. This study proved the usefulness of heterocysts as a cell factory for anaerobic production from carbohydrate provided by photosynthesis in vegetative cells.

Key words: cyanobacteria, anaerobic fermentation, photosynthesis, butanol, heterocyst

緒 言

微細藻類による化学品や燃料の生産は、光合成により CO₂を原料として物質生産を行うことができるため、 CO₂排出削減に大きく貢献すると期待されている. 微細 藻類の中でも原核生物であるシアノバクテリアは、遺伝 子操作が容易であり、また細胞構造も単純であるため、 代謝工学の宿主として広く利用されている. シアノバク テリアに新規代謝経路が導入され、燃料や化学品の原料 として利用可能な様々な物質を生産する株が作り出され ている(Angermayr *et al.*, 2015). これまでにシアノバ クテリアの代謝工学により、エタノール(Dexter & Fu, 2009)、イソプロパノール(Kusakabe *et al.*, 2013)、1-ブタノール(Lan & Liao, 2011)、イソブタノール(Atsumi *et al.*, 2009)、2-メチル-1-ブタノール(Shen & Liao, 2012)、1,2-プロパンジオール(Li & Liao, 2013)、そし て 2,3-ブタンジオール (Oliver et al., 2013; Savakis et al., 2013) などの様々なアルコールを生産する株が作製さ れている.しかし、その生産性は低く、商業生産のため には生産性の更なる向上が不可欠である (Case & Atsumi, 2016).生産性が低い原因の一つとして、光合 成条件下での糖異化活性が低い点が挙げられる.多くの 物質の発酵生産の基質としてビルビン酸やアセチル CoA が用いられるが、その供給が制限されている (Hirokawa et al., 2015).単細胞性シアノバクテリア Synechococcus elongatus PCC 7942 では、アセチル CoA とアセチルリン 酸との変換を触媒するリン酸アセチルトランスフェラー ゼをコードする pta 遺伝子を導入することで、光合成条 件下でのイソプロパノール生産が可能となっている (Hirokawa et al., 2017).

シアノバクテリアにおける生産性向上を妨げるもう-つの要因は、光合成の副産物として必然的に発生する酸素である.酸素は、金属を補因子として持つ酵素を始め として、非常に多くの酵素を失活させてしまう.発酵は、

E-mail: ehira@tmu.ac.jp

通常酸素が存在しない条件下で行われる反応であるた め、その反応には酸素感受性酵素が多く含まれる.実際、 偏性嫌気性細菌 Clostridium acetobutylicumの1-ブタノー ル合成経路には酸素感受性酵素が含まれるため、この経 路を導入した S. elongatus PCC 7942 では、酸素発生を停 止させた上でさらに嫌気状態にしないと1-ブタノール の生産が起こらない(Lan & Liao, 2011).一方で、酸素 感受性酵素を同じ反応を触媒する酸素耐性のある酵素に 置き換えることで、酸素による生産阻害を回避すること ができる(Lan et al., 2013).このように酸素を発生す る光合成と酸素感受性酵素による発酵をいかに両立させ るかが、シアノバクテリアを始めとする微細藻類による 物質生産の課題の一つとなっている.

シアノバクテリアは、酸素発生と酸素感受性酵素の問 題を解決する手段をもともと備えている.多くのシアノ バクテリアは窒素固定を行うことができるが、窒素固定 反応を触媒する酵素ニトロゲナーゼは酸素に非常に弱い 酵素である.シアノバクテリアは窒素固定を光合成から 時間的、あるいは空間的に分離することでこの二つの反 応を両立させている.多くのシアノバクテリアは、光を 必要とする光合成を昼間に行い. 光合成を行うことがで きない夜に窒素固定を行っている (Grobbelaar et al., 1986). 一方, 一部の糸状性シアノバクテリアは, 光合 成と窒素固定を空間的に分離することで、昼間に同時に この二つの反応を行うことを可能にしている. Anabaena sp. strain PCC 7120 (以下,アナベナ) などの 糸状性シアノバクテリアは,数百の栄養細胞が一列につ ながった糸状体を形成する(Fig.1A). 窒素化合物が培 地中に存在するとアナベナの糸状体は栄養細胞のみから 構成されているが、窒素化合物が無くなるとヘテロシス トと呼ばれる細胞がおよそ10~15細胞おきに1個の割 合で形成される (Flores & Herrero, 2010). ヘテロシス トは、窒素固定のみを行う分化細胞である.酸素感受性 のニトロゲナーゼを酸素から保護するために、ヘテロシ スト内は嫌気的な環境に保たれている.酸素を発生する 光合成が停止しているだけでなく、多糖と糖脂質からな る2層の外膜を細胞壁の外側に形成し、細胞外からの酸 素の流入を防いでいる. さらに, 酸素呼吸を活性化する ことで細胞内の酸素濃度を600nMにまで低下させてい る (Tomitani et al., 2006). ヘテロシストは光合成を行 うことができないため、窒素固定に必要なエネルギーを 隣接した栄養細胞に依存している.栄養細胞が光合成に より作り出した糖を主にスクロースとして受け取り, そ の異化により窒素固定に必要な ATP と還元力を得てい る (Cumino *et al.*, 2007; Nurnberg *et al.*, 2015) (Fig. 1B). 1分子のN,を2分子のNH₄⁺に還元するためには16分子 のATPと8個の電子が必要であり、ヘテロシストにお

いては糖異化活性を高めるために糖異化酵素の発現が増加する(Winkenbach & Wolk, 1973).嫌気的な細胞内環境に加え,高い糖異化活性を持つヘテロシストは,発酵による物質生産を行わせる細胞として多くの利点を備えている.実際,ヘテロシストにおいてエタノールを生産させるためにピルビン酸脱炭酸酵素とアルコール脱水素酵素を発現させると、一細胞当たりのエタノール生産量は、単細胞性シアノバクテリアの生産量のおよそ3倍に達することが示されている(Ehira *et al.*, 2018).

本研究では、アナベナの分化細胞ヘテロシストを物質 生産細胞として利用することで、酸素感受性酵素による 発酵生産と光合成を同時に行わせることが可能であるか を検証した. C. acetobutylicum がもつ1-ブタノール合成 経路をヘテロシストにおいて発現させたところ、光合成 条件下で1-ブタノールが生産されることが示された. さらにヘテロシスト特異的な遺伝子発現抑制システムを 構築し、ヘテロシストの代謝改変により生産性を向上さ









せることにも成功した.本研究の成果は、ヘテロシスト の物質生産細胞としての可能性を提示するものである.

実験方法

使用したアナベナ株と培養条件

アナベナ株の培養には、20mM HEPES-NaOH (pH7.5) を添加した BG-11 培地を用いた (Rippka *et al.*, 1979). 30~35µmol photons/m⁻²/s⁻¹の白色光連続照射条件で、 1% CO₂を含む空気を通気しながら30℃で培養した. 必要な時には、スペクチノマイシンとストレプトマイシ ンをそれぞれ2µg/mlずつ培地に添加した.1-ブタノー ルおよびエタノールを生産させるときには、OD₇₅₀がお よそ1になるまで培養した対数増殖期後期の細胞を集菌 し、窒素源を含まないBG-11培地(BG-11₀)で2回洗 浄後、OD₇₅₀が0.2になるようにBG-11₀に懸濁し、ヘテ ロシスト形成の誘導およびアルコール生産を開始させ た.本研究で使用した株をTable1に示す.

Strain or plasmid	Derivation and/or relevant characteristics	Reference	e		
Anabaena sp. strain					
PCC 7120	CC 7120 Wild type		(Kaneko et al., 2001)		
BU1	PCC 7120 derivative, in which pBU1 was integrated in the	(Higo	&	Ehira	
	genome	2019a)			
BU2	PCC 7120 derivative, in which pBU2 was integrated in the	(Higo	&	Ehira	
	genome	2019a)			
BU11	BU2 Δldh	(Higo	&	Ehira	
		2019a)			
2c	PCC 7120 derivative, in which p2c was integrated in the	(Higo	&	Ehira	
	genome	2019b)			
	PCC 7120 derivative, in which p2e was integrated in the	(Higo	&	Ehira	
2e	genome	2019b)			
Plasmids					
pSU102-cyaA	Sp/Sm ^R ; A neutral site-integrating vector	(Higo et	al. 20	18a)	
	Sp/Sm ^R ; pSU102-cyaA-based suicide vector.	/TT*	0		
pBU1	P _{coxBII} -pbuE-nphT7:	(Higo	æ	Ehira	
	P _{nifB} -theo-crt-bcd-etfB-etfA-hbd-adhE2	2019a)			
pBU2	Sp/Sm ^R ; pSU102-cyaA-based suicide vector.	(Higo	&	Ehira	
	P _{coxBII} -pbuE-nphT7: P _{nifB} -theo-crt-ter-hbd-adhE2	2019a)			
	Sp/Sm ^R ; pSU102-cyaA-based suicide vector.		_		
p2c	PpetE-tetRLVA: PL03-trigger RNA: PcoxBII-switch	(Higo	&	Ehira	
	RNA-dcas9: promoter-less sgRNA for glnA	2019b)			
	Sp/Sm ^R ; pSU102-cyaA-based suicide vector.				
p2e	PpetE-tetRLVA: PL03-trigger RNA: PcoxBII-switch	(Higo	&	Ehira	
	RNA- $dcas9$: P ₁₀₂ -soRNA for σlnA				

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Km/Nm^R, kanamycin and neomycin resistance; Sp/Sm^R, spectinomycin and streptomycin resistance.

プラスミドの構築およびアナベナの形質転換

全てのプラスミドは hot fusion 法により作製した(Fu et al., 2014). プロモーター領域, リボスイッチそして 各遺伝子のコード領域を含む DNA 断片を PCR により増 幅し, ゲノム組み込み用ベクター pSU102-cyaAの BamHI と KpnI サイトの間にクローニングした(Table 1). クローニングした DNA 断片は全て,シークエンシ ングにより配列を確認した. *ldh* 遺伝子破壊用プラスミ ド pBU11 は, *ldh* の上流領域, *nptII*, および *ldh* の下流 領域を PCR で増幅し, アナベナ遺伝子破壊用プラスミ ド pRL271(Cai & Wolk, 1990)の PstI サイトにクロー ニングすることで作製した.

アナベナは、大腸菌の接合により形質転換した(Elhai & Wolk, 1988). sacB 遺伝子の組換えによりスクロース 感受性になった株から、スクロース耐性株を選抜するこ とで二点交叉株を得た(Cai & Wolk, 1990). 全てのゲ ノムコピーで目的の組換えが起こっていることは、PCR により確認した.

1-ブタノールとエタノールの定量

1-ブタノールを生産させている培養液を取り、21,500 ×gで5分間の遠心分離により細胞を沈殿させた.99 μ l の上清を取り、内部標準として1 μ lの0.1% (v/v) 2-ブ タノールと混ぜた.1-ブタノールの定量は、水素炎イ オン化型検出器とGaskuropack 54 60/80を充填したス テンレスカラム(長さ2m,直径3mm)を装備したガ スクロマトグラフ(GC-2014;島津製作所)を用いて行っ た.カラム温度は190℃,注入口と検出器の温度は 240℃に保った.

エタノールの定量においては、遠心分離後の上清 500µlに内部標準として1mg/mlの2-プロパノールを 50µl加えた.混合液を1.5mlのバイアル瓶に移し、密栓 した状態で60℃に20分間静置した.ヘッドスペースの エタノール濃度を上記のガスクロマトグラフで定量し た.カラム温度は140℃,注入口と検出器の温度は 180℃に保った.

ヘテロシストの単離とウエスタンブロット解析

糸状体からのヘテロシストの単離は、Golden et al. (1991)の方法に従って行った.単離前の糸状体および 単離したヘテロシストを遠心分離により集め、 400μ lの 抽出緩衝液(25mM HEPES-NaOH (pH7.5)、1mM EDTA、5mM 2-メルカプトエタノール、1× protease inhibitor cocktail (Roche))に懸濁した. 菌体を Bullet Blender (Next Advance)を用いてステンレスビーズ(直 径 0.2mm)で破砕後、遠心分離により細胞残渣とステ ンレスビーズを沈殿させ、上清をウエスタンブロット解 析に用いた. ウエスタンブロット解析はHigo *et al.* (2018a)の方法に従って行った. GlnAの定量はImageJ (National Institutes of Health)を用いて行い, Student の*t*検定により有意差 ($p \le 0.05$)を検定した.

結 果

1-ブタノール合成経路の構築

C. acetobutylicumでは、アセトアセチル CoA から4個 の酵素の働きにより1-ブタノールが合成される (Fig.2A). これらの酵素をコードする遺伝子 crt. bcd. etfBA, hbd そして adhE2を一つのオペロンとして、ア ナベナに導入した(Fig.2B). ブタノール合成経路をへ テロシストでのみ発現させるために、ヘテロシスト特異 的な発現誘導系を利用した(Higo et al., 2018). ヘテロ シスト特異的なプロモーターである nifB プロモーター から、ブタノール合成オペロンを発現させた(Wang & Xu, 2005). プロモーターとオペロンの間には、テオフィ リン応答性のリボスイッチが挿入されており、テオフィ リン非存在下では ρ(Rho) 非依存的ターミネーターが 形成されることで転写が終結するため、ブタノール合成 オペロンは転写されない(Ma et al., 2014). テオフィリ ン存在下では、テオフィリンがmRNAと結合すること でターミネーター構造が壊れ、ブタノール合成オペロン が発現する. さらにブタノール合成オペロンと同時に, ブタノール合成の出発物質となるアセトアセチル CoA をマロニルCoAとアセチルCoAから合成する酵素 NphT7を導入した(Okamura *et al.*, 2010)(Fig.2A). nbhT7はヘテロシスト特異的プロモーターである coxBII プロモーターから発現し (Jones & Haselkorn, 2002). その転写は2-アミノプリン(2-AP)応答性リボスイッ チによる制御を受ける (Fig.2B). これら二つの遺伝子 ユニットをもつプラスミド pBU1 をアナベナゲノム中の cvaA 遺伝子内にある中立領域に挿入し(Katavama & Ohmori, 1997), ブタノール生産株 BU1 を作製した.

ヘテロシストにおける1-ブタノール生産

上記で作製したアナベナ株 BU1 が1-ブタノールを生 産することができるかを検証した.まず,窒素源を含む 培地で培養した BU1 を窒素源を含まない培地に移し, ヘテロシスト形成を誘導した.ヘテロシスト分化が完了 する分化誘導後 24 時間で,ブタノール合成経路の発現 を誘導するためにテオフィリンと 2-AP を添加した.そ の後,常に光を照射している条件下で10日間培養を続 けたところ,BU1 は 1.14 mg/lの1-ブタノールを生産し た(Fig.3A).一方,テオフィリンと 2-AP を加えなかっ た場合には,1-ブタノールは生産されなかった.Bcd/



Fig. 2 The metabolic pathway for 1-butanol production in heterocysts of engineered Anabaena. A. Vegetative cells fix CO₂ by photosynthesis and provide fixed carbon for heterocysts in the form of sucrose. In heterocysts, 1-butnol is produced from sucrose via pyruvate. PDH, pyruvate dehydrogenase; AccABCD, acetyl-CoA carboxylase; NphT7, Acetoacetyl-CoA synthase; Hbd, 3-hydroxybutyr-yl-CoA dehydrogenase; Crt, crotonase; Bcd/EtfAB, butyryl-CoA dehydrogenase/electron transferring flavoprotein complex; Ter, trans-2-enoyl-CoA reductase; AdhE2, bifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase. B. The schematic representation of artificial operons for butanol synthetic pathways introduced into Anabaena. Bcd/EtfAB complex or Ter was used as an enzyme that convert crotonyl-CoA to butyryl-CoA in strain BU1 or BU2, respectively.

EtfAB 複合体と AdhE2 は,酸素感受性酵素であると言われている(Inui et al., 2008; Atsumi et al., 2008). E. coli や Bacillus subtilis のような酸素呼吸を行う細菌においても、1-ブタノールの生産性は好気的条件下よりも嫌気的条件下での方が高い(Atsumi et al., 2008; Nielsen et al., 2009). 今回,これらの酵素を嫌気的な細胞内環境をもつへテロシストで発現させることで,酸素発生型光合成と酸素感受性のブタノール生産を同時に行わせることができることが示された.

フェレドキシン非依存型酵素 Ter の利用による生産性向上

Bcd/EtfAB 複合体はクロトニル CoA をブチリル CoA に変換する際,電子受容体として酸化型のフェレドキシンを必要とする.フェレドキシンに対する選択性があるため,異種の宿主細胞では機能が制限されることが知られている(Li *et al.*, 2008; Lan & Liao, 2011). そこで,Bcd/EtfAB 複合体を同じ反応を触媒するトランス-2-エノイル CoA 還元酵素(Ter) に置き換えるため. *bcd*





と etfBA を Treponema denticola 由来の ter に置き換えた 株 BU2 を作製した(Fig.2B)(Lan & Liao, 2011). Ter は補因子として NADH のみを必要とする酵素である (Fig.2A). BU2 における 1- ブタノール生産性を評価し たところ,生産開始後5日目までは直線的に濃度が増加 した(Fig.3B). その後,生産速度は低下したが 15日 目まで 1- ブタノール濃度は上昇を続けた. 生産 10日目 における生産量は,2.17 mg/1 であり,BU1 のおよそ2 倍のブタノールを生産した(Fig.3A). ヘテロシストに おいては Bcd/EtfAB 複合体が機能することができるが, その活性は 1- ブタノール生産の律速となっており,Ter に置き換えることで生産性が向上することが示唆された.

ピルビン酸競合経路の不活性化による生産性向上

BU2 株の1-ブタノール生産性をさらに向上させるた めに,BU2 を親株として乳酸脱水素酵素をコードする *ldh* 遺伝子を破壊したBU11を作製した(Fig.4A).乳酸 脱水素酵素は,NADHの酸化にともないピルビン酸か ら乳酸を生成する反応を触媒する(Fig.2A).1-ブタノー ルの生産に必要なピルビン酸とNADHを消費するため, その不活性化は1-ブタノール生産性の向上につながる と期待できる.BU11における10日間までの1-ブタノー ル生産性を評価したところ,BU2に比べて30%生産性 が向上した(Fig.4B).乳酸脱水素酵素の不活性化によ る生産性向上により,ピルビン酸からのアセチルCoA



Fig. 4 1-Butanol production by *ldh*-disrupted strain BU11. A. *ldh* was inactivated by replacing with neomycin-resistant cassette in BU2 to construct BU11. Disruption of *ldh* in BU11 was confirmed by PCR using the primer pair F and R. B. 1-Butanol concentration was measured 10 days after induction of the butanol synthetic pathway.

の生成量が増加したとともに、HbdやTerが必要とする NADHの消費が抑えられたことが生産量の増加につな がったと考えられる.

ヘテロシスト特異的代謝改変による生産性向上

BU11のようにゲノムから標的遺伝子を削除する遺伝 子欠失株では、その影響はヘテロシストに限らず栄養細 胞にも及ぶ、そのため、栄養細胞の機能に必須の遺伝子 を不活性化することはできない、ヘテロシストのみで遺 伝子機能を抑制することができれば、栄養細胞の光合成 活性を維持したまま、より物質生産に適した代謝経路を もつ株を作ることができる、そこで本研究では、 CRISPR干渉法(CRISPR interference; CRISPRi)を利 用してヘテロシスト特異的に遺伝子発現を抑制するシス テムの開発を行った。

CRISPRiでは、ヌクレアーゼ活性を失った Cas9 (dCas9)と標的配列に相補的なシングルガイドRNA (sgRNA)を発現させることで、標的遺伝子の発現を抑 制することができる (Qi et al., 2013). 言い換えれば, この2つの因子が同時に存在しないと機能することがで きない. ヘテロシスト特異的プロモーターから dCas9 を発現させることで、ヘテロシストのみで遺伝子発現が 抑制されると期待できる. そこで、nifBプロモーター からdCas9が発現し、テトラサイクリン誘導性プロモー ターから sgRNA が発現する株 2e を作製した (Fig. 5A). さらに、dCas9の発現タイミングを人為的に制御するた めにリボレギュレーターである toehold switch を利用し た. このシステムでは dcas9 の上流に挿入した switch RNAの働きで、リボソームがリボソーム結合サイトに 結合することが妨げられている. しかし、trigger RNA が switch RNA に結合するとリボソームが結合サイトに 結合できるようになるため、翻訳が活性化される. 本シ ステムでは trigger RNA はテトラサイクリン誘導性プロ モーターから発現するようにデザインされており、テト ラサイクリン存在下でのみ dCas9の翻訳が起こる (Higo et al., 2018). ネガティブコントロールとして, sgRNA が発現しない株2cも作製した(Table 1). sgRNAの標 的遺伝子としては、ヘテロシストにおいて高発現する glnAを用いた.glnAはグルタミン合成酵素をコードし ており、窒素同化に必須の遺伝子である. そのため、シ アノバクテリアではglnAを不活性化することはできな い. 2eにおける GlnAの発現は、栄養細胞ではテトラサ イクリン存在下でも変化しなかったが、ヘテロシストで はテトラサイクリンにより減少した(Fig.5B, C). また, 2cではテトラサイクリンの添加はGlnAの発現に影響し なかった.以上の結果から、2eではテトラサイクリン で dCas9と sgRNA の発現を誘導することで、ヘテロシ



- Fig. 5 Repression of GlnA in heterocysts by CRISPR interference. A. The schematic representation of CRISPR interference system introduced into *Anabaena. dcas9* is expressed from the heterocyst-specific promoter PnifB and sgRNA is expressed from the anhydrotetracycline (aTc)-inducible promoter PL03. Switch RNA, which is located upstream of *dcas9*, inhibits translation of *dcas9* by preventing ribosome from binding to the ribosome-binding site. Trigger RNA, which is also expressed from PL03, is base-pairing with switch RNA, resulting in derepression of *dcas9* translation. Thus, dCas9 is expressed within heterocysts only in the presence of aTc. B. Repression of GlnA in heterocysts. Heterocysts were enriched 72h after induction. Total protein was extracted from whole filaments (lane w) and enriched heterocysts (lane H), and western blot analyses using anti-GlnA, anti-RbcL, and anti-NifH antibodies were conducted. RbcL and NifH were used as marker proteins for vegetative cells and heterocysts, respectively. C. Quantification of GlnA expression levels in whole filaments and heterocysts. The GlnA level of whole filaments of 2c in the absence of aTc was taken as 100.
- スト特異的に遺伝子発現を抑制できることが示された. ヘテロシストでは窒素固定で作られたアンモニウムイ オンが、グルタミン合成酵素により取り込まれることで 窒素化合物に変換される. そのため、GlnAの発現が低

下すると窒素同化が抑制され, ヘテロシストではより窒 素固定を行うために糖異化活性が上昇すると考えられる (Higo *et al.* 2016). GlnAの発現抑制により物質生産性 が向上するかを評価するため, 2e にエタノール合成プ ラスミド pET1を導入した. pET1は, エタノール合成 に必要なピルビン酸デカルボキシラーゼとアルコール脱 水素酵素をヘテロシスト特異的に発現させるプラスミド である(Ehira *et al.* 2018). pET1をもつ2e株のエタノー ル生産量は, pET1をもつ2c株と比べ, 30%増加してい た (Fig.6).

考 察

本研究では、ヘテロシストにおいて C. acetobutylicum の1-ブタノール合成経路を発現させることで、光合成 条件下で1-ブタノールの生産が可能であることを示し た. ヘテロシストでは、元々の生産菌が持っている活性 が高く、生産に適した酵素をそのまま利用することがで き、生産性の向上が期待できる.また、これまで酸素発 生型光合成との両立が不可能であった代謝経路を利用し た物質生産を実現することも可能である.本研究の成果 は、ヘテロシストの物質生産細胞としての有用性を示し、 光合成による物質生産の可能性を大きく広げるものである.

ヘテロシストにおいては、酸素感受性のBcd/EtfAB 複合体が機能することが示された.しかし、Bcd/EtfAB 複合体をTerに置き換えることで1-ブタノール生産量 は2倍に増加し、この酵素が生産の律速となっていたこ とが示唆された.フェレドキシンを電子受容体として必 要とするBcd/EtfAB 複合体は、フェレドキシンに対す る選択性のために異種宿主で機能させることが困難で あった(Li *et al.*, 2008; Lan & Liao, 2011).しかし、ヘ



Fig. 6 Ethanol production in the GlnA-repressed strain 2e/ pET1. GlnA expression was repressed in heterocysts by the addition of aTc, and ethanol concentration was measured 48h after the GlnA repression. The relative ethanol level in the presence of aTc to that in the absence of aTc is shown. テロシストにおいては C. acetobutylicum のフェレドキシ ンを発現させることなく, Bcd/EtfAB 複合体が機能し た.アナベナは複数種類のフェレドキシンを持っており, ヘテロシストではニトロゲナーゼへの電子供与体として 特別なフェレドキシンも発現している(Magnuson & Cardona, 2015). これらのフェレドキシンのいずれかが Bcd/EtfAB 複合体と共に機能すると考えられるが, Bcd/EtfAB 複合体に対して最適なものであるかは定か ではない. C. acetobutylicum のフェレドキシンをヘテロ シストで発現させることで, Bcd/EtfAB 複合体を利用 した1-ブタノールの生産性をさらに向上させることが できる可能性がある.

乳酸脱水素酵素の不活性化により、1-ブタノールの 生産量は増加した、したがって、ピルビン酸の供給量を 増加させることが, 生産性の向上に重要であることが示 唆される. ヘテロシストでのエタノール生産においても. スクロース分解酵素や解糖系の酵素、あるいはアラニン 脱水素酵素の発現量を増加させピルビン酸の供給量を増 やすことで、生産量が増加することが示されている (Ehira et al. 2018). ヘテロシスト内の代謝を物質生産 に最適化していくことで、更なる生産性の向上が期待で きる.本研究では、CRISPRiによるヘテロシスト特異的 な遺伝子発現抑制システムを開発することにも成功し た. 本システムにより, 栄養細胞の増殖や生存に必須の 遺伝子であっても、 ヘテロシストのみでその発現を抑制 することが可能となる.実際,増殖に必須のグルタミン 合成酵素の発現をヘテロシストにおいて抑制し、ヘテロ シスト代謝を活性化することで物質生産量が増加するこ とが示された.本システムを用いて、ホスホエノールピ ルビン酸カルボキシラーゼをコードする必須遺伝子であ る ppc などの発現をヘテロシスト特異的に抑制すること で、増殖に影響を与えることなく、ヘテロシストでのピ ルビン酸供給量を増加させることが可能となる(Lu & Coleman, 1990). 今後はヘテロシスト代謝をさらに物質 生産に最適化した形に作り換え、生産性をさらに向上さ せ、実用化へとつなげていく.

要 約

酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアを利用した CO₂からの有用物質生産は,化石燃料に依存しない持続 可能な社会システムの構築に大きく貢献すると期待され ている.これまでに新たな代謝経路を導入することで, 様々な有用物質を生産するシアノバクテリアがつくり出 されてきた.しかし,嫌気的な代謝酵素系を用いた物質 生産では,光合成の副産物として生成される酸素により 導入した酵素が失活してしまうため,期待通りの生産性 を示さないことが多く,新たな物質生産系の開発が求め られている.

光合成を行う栄養細胞が数百個一列につながる多細胞 性シアノバクテリア Anabaena sp. strain PCC 7120 は, ヘテロシストと呼ばれる分化細胞をおよそ10細胞ごと に一個の割合で形成する. ヘテロシストは窒素固定に特 殊化した細胞であり,酸素に極めて弱い窒素固定酵素ニ トロゲナーゼを酸素から保護するために,細胞内環境が 嫌気的に維持されている.本研究では,ヘテロシストを 物質生産細胞として利用することで,光合成を行いなが ら同時に嫌気発酵による有用物質生産が可能であるかを 検証した.

1-ブタノールはエタノールよりも優れたバイオ燃料 として期待されている。 偏性嫌気性細菌 Clostridium acetobutylicum は1-ブタノールを合成することができる が、その合成経路には複数の酸素感受性酵素が含まれる. 我々はヘテロシスト特異的なプロモーターを利用して, C. acetobutylicum のブタノール合成経路を構成する7個 の遺伝子をヘテロシストにおいて発現する株を構築し た. そしてその株を用いて, 光合成条件下で効果的にブ タノールを生産させることに成功した、本研究により、 ヘテロシストを物質生産細胞として利用することで、酸 素発生型光合成と嫌気発酵という相反する反応を同時に 行わせることができることが示された. シアノバクテリ アではこれまで利用することができなかった酸素感受性 酵素を利用した物質生産が可能となり、シアノバクテリ アによる CO。からの有用物質生産の可能性が飛躍的に 広がると期待できる.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 得平茂樹. 2017. 酸素発生型光合成で駆動する嫌気発酵 プロセス. 第8回日本光合成学会年会,5月27-28日,滋賀
- Ehira, S. 2018. Redox regulation of cellular differentiation in cyanobacteria. CLS, Tokyo Tech. International Forum 2018, 4 March, Tokyo, Japan
- 3)肥田真太朗,得平茂樹.2018.シアノバクテリアにおける多様な分化細胞を生み出す分子機構の解明.第12回日本ゲノム微生物学会年会,3月5-7日,京都
- 4)得平茂樹,肥後明佳,竹内卓人.2018.糸状性シアノバ クテリアの細胞種特異的代謝工学による嫌気的バイオ燃 料生産.第59回日本植物生理学会年会,3月28-30日,札幌
- 5) 大塚夏海,得平茂樹. 2018. 窒素・炭素代謝のグローバル レギュレーターNtcAのレドックス制御. 第9回日本光合成 学会年会,5月26-27日,仙台
- 6) Kurio, Y., Koike, Y., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H. & Ehira, S. 2018. DevH is a global regulator of the heterocyst-specific genes that are upregulated at the later stage of differentiation. 16th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, 5-10 August, Vancouver, Canada

原著論文

- Ehira, S., Takeuchi, T. & Higo, A. 2018. Spatial separation of photosynthesis and ethanol production by cell type-specific metabolic engineering of filamentous cyanobacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102: 1523–1531.
- 2) Higo, A., Isu, A., Fukaya, Y., Ehira, S. & Hisabori, T. 2018a. Application of CRISPR interference for metabolic engineering of the heterocyst-forming multicellular cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. Plant Cell Physiol. **59**: 119-127.
- 3) Higo, A. & Ehira, S. 2019a. Anaerobic butanol production driven by oxygen-evolving photosynthesis using the heterocyst-forming multicellular cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. Appl. Microbiol. Biotechnol. **103**: 2441–2447.
- 4) Higo, A. & Ehira, S. 2019b. Spatiotemporal gene repression system in the heterocyst-forming multicellular cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. ACS Synth. Biol. 8: 641–646.
- Higo, A., Nishiyama, E., Nakamura, K., Hihara, Y. & Ehira, S. 2019. cyAbrB transcriptional regulators as safety devices to inhibit heterocyst differentiation in *Anabaena*. J. Bacteriol. 201: e00244-19.

その他

得平茂樹. 2018. 餅は餅屋;分化細胞の転職は実現するか?. 生物工学96:656.

謝 辞

本研究を行うにあたり,多大なる助成をいただきまし た公益財団法人発酵研究所に深く感謝申し上げます.ま た,本研究実施に大きく尽力していただいた肥後明佳博 士(現地球環境産業技術研究機構)に感謝いたします.

文 献

- Angermayr, S.A., Gorchs Rovira, A. & Hellingwerf, K.J. 2015. Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products. Trends Biotechnol. 33: 352–361.
- Atsumi, S., Cann, A.F., Connor, M.R., Shen, C.R., Smith, K.M., Brynildsen, M.P., et al. 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. Metab. Eng. 10: 305–311.
- Atsumi, S., Higashide, W. & Liao, J.C. 2009. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. Nat. Biotechnol. **27**: 1177–1180.
- Cai, Y.P. & Wolk, C.P. 1990. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. J. Bacteriol. **172**: 3138–3145.
- Case, A.E. & Atsumi, S. 2016. Cyanobacterial chemical production. J. Biotechnol. 231: 106–114.
- Cumino, A.C., Marcozzi, C., Barreiro, R. & Salerno, G.L. 2007. Carbon cycling in *Anabaena* sp. PCC 7120. Sucrose synthesis in the heterocysts and possible role in nitrogen fixation. Plant Physiol. 143: 1385–1397.
- Dexter, J. & Fu, P. 2009. Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production. Energy Environ. Sci. 2: 857.

- Elhai, J. & Wolk, C.P. 1988. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. Gene **68**: 119–138.
- Flores, E. & Herrero, A. 2010. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. Nat. Rev. Microbiol. 8: 39–50.
- Fu, C., Donovan, W.P., Shikapwashya-Hasser, O., Ye, X. & Cole, R.H. 2014. Hot Fusion: An efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase. PLoS One 9: e115318.
- Golden, J.W., Whorff, L.L. & Wiest, D.R. 1991. Independent regulation of *nifHDK* operon transcription and DNA rearrangement during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J. Bacteriol. **173**: 7098-7105.
- Grobbelaar, N., Huang, T.C., Lin, H.Y. & Chow, T.J. 1986. Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. FEMS Microbiol. Lett. 37: 173–177.
- Higo, A., Isu, A., Fukaya, Y. & Hisabori, T. 2016. Efficient gene induction and endogenous gene repression systems for the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. Plant Cell Physiol. 57: 387–396.
- Higo, A., Isu, A., Fukaya, Y. & Hisabori, T. 2018b. Spatio-temporal gene induction systems in the heterocyst-forming multicellular cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. Plant Cell Physiol. 59: 82–89.
- Hirokawa, Y., Dempo, Y., Fukusaki, E. & Hanai, T. 2017. Metabolic engineering for isopropanol production by an engineered cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, under photosynthetic conditions. J. Biosci. Bioeng. **123**: 39–45.
- Hirokawa, Y., Suzuki, I. & Hanai, T. 2015. Optimization of isopropanol production by engineered cyanobacteria with a synthetic metabolic pathway. J. Biosci. Bioeng. 119: 585–590.
- Inui, M., Suda, M., Kimura, S., Yasuda, K., Suzuki, H., Toda, H. et al. 2008. Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77: 1305–1316.
- Jones, K.M. & Haselkorn, R. 2002. Newly identified cytochrome c oxidase operon in the nitrogen-fixing cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120 specifically induced in heterocysts. J. Bacteriol. 184: 2491–2499.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M. & Tabata, S. 2001. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. DNA Res. 8: 205-213.
- Katayama, M. & Ohmori, M. 1997. Isolation and characterization of multiple adenylate cyclase genes from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J. Bacteriol. **179**: 3588–3593.
- Kusakabe, T., Tatsuke, T., Tsuruno, K., Hirokawa, Y., Atsumi, S., Liao, J.C. & Hanai, T. 2013. Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production directly from carbon dioxide and light. Metab. Eng. 20: 101–108.
- Lan, E.I. & Liao, J.C. 2011. Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide. Metab. Eng. 13: 353–363.

Lan, E.I., Ro, S.Y. & Liao, J.C. 2013. Oxygen-tolerant coenzyme

A-acylating aldehyde dehydrogenase facilitates efficient photosynthetic n-butanol biosynthesis in cyanobacteria. Energy Environ. Sci. **6**: 2672–2681.

- Li, F., Hinderberger, J., Seedorf, H., Zhang, J., Buckel, W. & Thauer, R.K. 2008. Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. J. Bacteriol. **190**: 843–850.
- Li, H. & Liao, J.C. 2013. Engineering a cyanobacterium as the catalyst for the photosynthetic conversion of CO₂ to 1,2-propanediol. Microb. Cell Fact. **12**: 4.
- Lu, I. & Coleman, J.R. 1990. A requirement for phosphoenolpyruvate carboxylase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. Arch. Microbiol. 154: 471–474.
- Ma, A.T., Schmidt, C.M. & Golden, J.W. 2014. Regulation of gene expression in diverse cyanobacterial species by using theophylline-responsive riboswitches. Appl. Environ. Microbiol. 80: 6704–6713.
- Magnuson, A. & Cardona, T. 2015. Thylakoid membrane function in heterocysts. Biochim. Biophys. Acta 1857: 25–27.
- Nielsen, D.R., Leonard, E., Yoon, S.-H., Tseng, H.-C., Yuan, C. & Prather, K.L.J. 2009. Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. Metab. Eng. 11: 262–273.
- Nurnberg, D.J., Mariscal, V., Bornikoel, J., Nieves-Morison, M., Kraus, N., Herrero, A. *et al.* 2015. Intercellular diffusion of a fluorescent sucrose analog via the septal junctions in a filamentous cyanobacterium. mBio 6: 1–12.
- Okamura, E., Tomita, T., Sawa, R., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. 2010. Unprecedented acetoacetyl-coenzyme A synthesizing enzyme of the thiolase superfamily involved in the mevalonate pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 11265–11270.
- Oliver, J.W.K., Machado, I.M.P., Yoneda, H. & Atsumi, S. 2013. Cyanobacterial conversion of carbon dioxide to 2,3-butanediol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110: 1249–1254.
- Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L. a, Doudna, J. a, Weissman, J.S., Arkin, A.P. & Lim, W. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell 152: 1173–1183.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111: 1–61.
- Savakis, P.E., Angermayr, S.A., & Hellingwerf, K.J. 2013. Synthesis of 2,3-butanediol by *Synechocystis* sp. PCC6803 via heterologous expression of a catabolic pathway from lactic acid- and enterobacteria. Metab. Eng. 20: 121–30.
- Shen, C.R. & Liao, J.C. 2012. Photosynthetic production of 2-methyl-1-butanol from CO₂ in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 and characterization of the native acetohydroxyacid synthase. Energy Environ. Sci. 5: 9574–9583.
- Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M. & Ohno, T. 2006. The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 5442–5447.
- Wang, Y. & Xu, X. 2005. Regulation by *hetC* of genes required for heterocyst differentiation and cell division in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J. Bacteriol. 187: 8489–8493.
- Winkenbach, F. & Wolk, C.P. 1973. Activities of enzymes of the oxidative and the reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of a blue-green alga. Plant Physiol. 52: 480–483.

平成25年度寄付講座助成の研究報告

助成期間:平成25年10月~平成31年3月

腸内シンビオシスの分子機序解明とその高度応用展開 栗原新

石川県立大学生物資源環境学部寄付講座腸内細菌共生機構学 〒921-8836 石川県野々市市末松1-308

Elucidation of molecular mechanism of intestinal symbiosis and its advanced application Shin Kurihara

Host-Microbe Interaction Research Laboratory Faculty of Bioresources and Environmental Sciences Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

The aim of this donation course is to elucidate the symbiotic relationship between the host and intestinal bacteria from a viewpoint of low-molecular-weight compounds produced by the host or gut microbiota. We defined those compounds that affect each physiological function across taxonomic boundaries as "symbiogenic factors". In this research, we studied on polyamines that are symbiogenic factors delivered from the gut microbiota to humans, phenethylamine that is a candidate for a novel symbiogenic factor, and human milk oligosaccharides that are symbiogenic factors delivered from human to the gut microbiota. Furthermore, we report our development of culture system that is useful to clarify the symbiotic mechanism between the gut microbiota and the host.

Key words: symbiogenic factor, intestinal bacteria, polyamines, phenethylamine, human milk oligosaccharides, culture system, symbiosis.

第1章 はじめに

本寄付講座は、宿主または腸内細菌が産生する低分子 化合物で、分類学上の界を越えてお互いの生理機能に影 響を与える因子を「シンビオジェニック因子」と定義 (Fig.1)し、この定義にあてはまる化合物を軸として 宿主と腸内細菌の共生関係を明らかすることを目的とし て設立された.

ヒトはその腸管内に重量にして1kg,細胞数にしてヒ ト細胞とほぼ同数の腸内細菌を有している.ヒトー人の 腸管に存在する腸内細菌種は150以上であり,これらの 混合物は「腸内細菌叢」と呼ばれている.近年,爆発的 に進化した核酸の解析技術により,腸内常在菌叢と肥満

栗原 新 (skurihara@waka.kindai.ac.jp) (現所属:近畿大学生 物理工学部 〒 649-6433 和歌山県紀の川市西三谷 930)

教員

- 阪中幹祥(現所属: National Food Institute, Technical University of Denmark),
- 片山高嶺 (現所属:京都大学大学院生命科学研究科)

(Turnbaugh et al., 2006)・糖尿病 (Suez et al., 2014)・自 閉症 (Hsiao et al., 2013) などの様々な疾病が密接に関連 していることが明らかとなった.この結果,腸内常在菌 叢は「もう一つの臓器」とも呼ばれ始め,その適切な制 御は人類の健康寿命延伸に最も重要な課題の一つである と考えられている.

腸内常在菌の菌体そのものは大腸の免疫機構に阻まれ て、ごく一部しかヒト組織に接触できない.対照的に、 腸内常在菌により産生される低分子化合物(腸内常在菌 が産生するシンビオジェニック因子)は、腸管上皮を通 過して体内に取り込まれ、宿主健康に対してより直接的 な影響を与える.一方で、宿主はその免疫機構のほかに、 様々な低分子化合物(宿主が産生するシンビオジェニッ ク因子)を用いて「もう一つの臓器」である腸内常在菌 叢を適切に制御していると考えられる.

本論では,腸内細菌からヒトへと受け渡されるシンビ オジェニック因子であるポリアミン及びシンビオジェ ニック因子候補であるフェネチルアミン,ヒトから腸内 細菌に受け渡されるシンビオジェニック因子であるヒト 母乳オリゴ糖についての研究成果を報告する.さらに, 腸内細菌と宿主の共生機構を解明する際に有用な培養シ

E-mail:

栗 原 新



Fig. 1 Symbiogenic factors

The aim of this donation course is to elucidate the symbiotic relationship between the host and intestinal bacteria from a viewpoint of low-molecular-weight compounds produced by the host or gut microbiota. We defined those compounds that affect each physiological function across taxonomic boundaries as "symbiogenic factors"

ステムの開発についての研究成果を報告する.

第2章 研究概要

1) ヒト腸内常在菌叢最優勢種のハイスループット培養 系の開発

近年、培養を介さないマイクロビオーム解析によりヒ ト腸内常在菌叢最優勢56種が報告された(Qin et al., 2010). これら 56 種のうち 44 種についてはその基準株 が菌株保存・分譲機関から入手可能であった. 我々はヒ ト腸内に実際に最優勢に存在する菌種を用いて生理学的 なアッセイを行う目的で、これら44 菌種のコレクショ ンを作成した.この過程で、菌株保存・分譲機関による 推奨培地は菌種間で様々であるために、ヒト腸内常在菌 叢最優勢種同士の生理学的な比較が困難であることが明 らかとなった. また、推奨培地の多くはその作成法が煩 雑で、 牛ルーメン液などの入手困難な材料を必要とする ものも多いため、腸内常在菌叢最優勢種の生菌体を用い た研究に対するハードルは依然として高いことも明らか となった. 我々はこれらの問題を解決するために, 腸内 細菌培養培地として知られる Gifu Anaerobe Medium (GAM) (Yamamoto-Osaki et al., 1994) における腸内常 在菌叢最優勢種の生育の可否を調べた. この結果, ヒト

腸内常在菌叢最優勢56種のうち入手可能な44種につい て、作成の容易なGAM培地を用いて32種が培養可能 であることを示した.これはヒト腸内常在菌叢最優勢 56種の57%、入手可能な44種の73%であった(Gotoh *et al.*, 2017).さらに、GAMで培養可能な32菌種を96 穴マイクロディープウェルプレート上で一斉に培養可能 なハイスループット培養系を開発した.

2) ポリアミン

ポリアミンは,動脈硬化等の心血管系疾患の予防作用 や炎症抑制やオートファジー誘導を介した寿命延伸作用 が明らかになったことから,近年注目が集まっている物 質であり,腸内常在菌からヒトへ受け渡されるシンビオ ジェニック因子である.

1)で開発したヒト腸内常在菌叢最優勢32種をGAM 培地での培養系における培養液を用いて、その細胞内お よび培養上清のポリアミン(プトレッシン、スペルミジ ン、スペルミン)の変動を定量し、この定量結果と各菌 種のゲノム上における既知ポリアミン代謝系・輸送系を 構成するタンパクホモログの有無とを突き合わせてみた. この結果、ヒト腸内常在菌叢最優勢32種のうち、新規ポ リアミン取り込み系を持つと推定されるものが少なくと も2菌種(Eubacterium siraeum, Collinsella aerofaciens)、 新規ポリアミン放出系を持つと推定されるものが少な くとも6菌種(Bacteroides dorei, Bacteroides stercoris, Dorea longicatena, Dorea formicigenerans, Ruminococcus torques, Blautia hansenii),新規ポリアミン合成系を持 つと推定されるものが少なくとも3菌種(D. longicatena, Parabacteroides merdae, E. ventriosum)存在した.以上 の見積もりは,一つの菌種が重複した機能を持つ遺伝子 を持たないと仮定して行われたため(例えば,ポリアミ ンの取り込みが観察された菌種の染色体にポリアミン取 り込み系のホモログが一つでも存在すれば新規のもの はないと仮定して見積もりを行った.),重複した機能 を持つ遺伝子の存在の可能性を考慮した場合は,さら に多くの機能未知遺伝子が存在することが考えられる (Sugivama et al., 2016).

ヒト腸内常在菌叢最優勢種で多くの未同定のポリアミ ン関連遺伝子が存在したことは、ヒト腸内常在菌叢最優 勢種の染色体上には、様々なシンビオジェニック因子の 生産に関わる多くの全く新規な重要遺伝子が存在するこ とを示唆しており、腸内環境の制御を腸内細菌由来のシ ンビオジェニック因子の制御を通じて行うためには、生 菌を用いた遺伝学的・生化学的実験により、より多くの 腸内細菌遺伝子を新規同定することが必要であると考え られる.

また, Enterococcus faecalis と大腸菌を混合して培養す ることで,腸内ポリアミンが複数の腸内細菌の代謝経路 を経由して生合成され,その生合成経路はビフィズス菌 等が産生する酸により作動することを明らかとした (Kitada et al., 2018).

3) フェネチルアミン

1)のハイスループット培養系における培養上清を解 析したところ, GAM 培地で培養可能なヒト腸内常在菌 叢最優勢32種のうち5菌種が細胞外に著量のフェネチ ルアミンを産生することを見出した.また、このフェネ チルアミン産生が芳香族アミノ酸脱炭酸酵素遺伝子 (*aadc*) に依存することを *E. faecalis* の *aadc* 破壊株・相 補株を用いて証明した.フェネチルアミン産生ヒト腸内 常在菌叢最優勢種の一種である E. faecalisの aadc 破壊 株・相補株を定着させたマウスを作成し、芳香族アミノ 酸の一種であるフェニルアラニンを多量に含む餌を与え たところ, aadcを大量発現する aadc 相補株を定着した マウスの大腸でセロトニン産生量が有意に増加してい た. また. ヒト糞便中の aadc 遺伝子量とフェネチルア ミン産生能に有意な正の相関があることを示した. 末梢 のセロトニンは骨代謝および蠕動運動を促進することが 知られており、過剰なセロトニン濃度を適正レベルに抑 制することで、骨粗鬆症や過敏性腸症候群の治療につな がる可能性が考えられた.一方で,セロトニン濃度が不 足する場合は腸内細菌のフェネチルアミン産生を促進す ることで,セロトニン濃度を適正レベルに保ち,便秘等 を抑制できる可能性が考えられた.

本研究では宿主に対する安全性が既に確立され,既に 一般に処方されている宿主由来 AADC の阻害剤を用い て腸内細菌由来 AADC を阻害し,腸管内でのフェネチ ルアミン生成を抑制することを最終的な目的とした. *In* vitro で AADC 阻害剤と共にフェネチルアミン産生ヒト 腸内常在菌叢最優勢種の一種である *E. faecalis* を培養し たところ,そのフェネチルアミン産生が大きく抑制され た. このことは,腸内代謝産物の遺伝子の特定により, 目的代謝産物の濃度の最適化を通じた疾病の制御の可能 性を示している.

4) ヒト母乳オリゴ糖

乳児期の腸内細菌叢は成長後も宿主の健康に影響を及 ぼすことが明らかとなってきている. 母乳栄養児の腸管 ではビフィズス菌優勢の細菌叢が形成されるが、この機 構にはビフィズス菌が有するヒト母乳オリゴ糖利用経路 (ヒト母乳オリゴ糖代謝関連遺伝子)が重要な役割を果た していることを. 乳児糞便の遺伝子解析やオリゴ糖解析 によって明らかとした. また, Bifidobacterium bifidum や一部のBifidobacterium longum が有する細胞表層グリ コシダーゼによって菌体外で分解された母乳オリゴ糖分 解物が、他のビフィズス菌種の生育を促進するという、 「菌種間クロスフィーディング機構」を明らかとした (Gotoh et al., 2018). さらに、二種のヒト母乳オリゴ糖 トランスポーターを新たに同定し、これらのヒト母乳オ リゴ糖に対する基質特異性は少しだけ異なること、その 違いには特定の数アミノ酸残基が関与していることを明 らかにした.より幅広い種類のヒト母乳オリゴ糖を取り 込めるトランスポーターが母乳栄養児の腸内で優占的に 存在していたことから、トランスポーターのヒト母乳オ リゴ糖への適応進化がビフィズスフローラ形成の鍵と なっていることが強く示唆された (Sakanaka et al., 2019).

5) 共生モデルの構築(アピカル嫌気培養法)の開発

腸内常在菌の多くは嫌気性である一方で、宿主の上皮 細胞には血流を介して酸素が供給されている.このよう な実際の腸管内環境を模した培養装置の開発に取り組ん だ結果、単層化したヒト上皮細胞培養株の頂端側を少な くとも5日間、溶存酸素濃度0.5%以下に、かつ基底膜 側を60%以上に維持することが可能となった.本装置 を用いて培養したCaco-2細胞では通常のCO₂インキュ ベーターで培養した細胞と同等のタイトジャンクション が形成されていた.さらに、頂端膜側において偏性嫌気

新

性細菌の増殖が観察された.本装置は,腸内細菌と宿主 の共生を *in vitro* で解析可能とするのみならず,食品素 材や医薬品の腸内動態を解析する上で有用なツールとな る可能性が示唆された.

第3章 おわりに

次世代シーケンサーの登場により、21世紀初頭から 糞便中の DNA, RNA の解析が精力的に行われ, 腸内常 在菌叢の組成・その塩基配列・遺伝子発現が明らかとなっ た. さらに、様々な質量分析装置の発達に伴い、糞便中 のメタボローム解析も精力的に行われている. しかしな がらこの中で, 腸内常在菌の遺伝子機能の多くは未知の ままである。ポリアミンをはじめとした腸内細菌由来シ ンビオジェニック因子の濃度を制御し人類の健康に資す るためには、腸内における生産メカニズムを解明する必 要がある. また, ヒト母乳オリゴ糖をはじめとした宿主 由来シンビオジェニック因子の腸内常在菌による資化機 構を解明することにより, 宿主側からの腸内細菌の適切 な制御が可能となる. このような制御を広く行うために はヒト腸内常在菌を培養し、シンビオジェニック因子の 合成・輸送・資化系を構成する遺伝子を同定し、遺伝子 の発現制御やその遺伝子がコードする酵素・トランス ポーターに対する阻害剤の標的を定める必要がある. 今 後はより多くの腸内常在菌について遺伝子レベルで解析 を行い、腸内常在菌叢の適切な制御によるヒト健康寿命 の延伸を目標として研究を展開していきたい.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成に よって開設された腸内細菌共生機構学寄付講座において 行われたものである.本助成を賜った発酵研究所に対し てここに厚く御礼申し上げます.本寄付講座世話人であ る石川県立大学・熊谷英彦参与のご支援とご協力に感謝 の意を表し,共同研究でお世話になりました多くの先生 方に深く御礼申し上げます.

文 献

Gotoh, A., Katoh, T., Sakanaka, M., Ling, Y., Yamada, C., Asakuma, S., Urashima, T., Tomabechi, Y., Katayama-Ikegami, A., Kurihara, S., Yamamoto, K., Harata, G., He, F., Hirose, J., Kitaoka, M., Okuda, S. & Katayama, T. 2018. Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. Sci. Rep. **8**: 13958.

- Gotoh, A., Nara, M., Sugiyama, Y., Sakanaka, M., Yachi, H., Kitakata, A., Nakagawa, A., Minami, H., Okuda, S., Katoh, T., Katayama, T. & Kurihara, S. 2017. Use of Gifu Anaerobic Medium for culturing 32 dominant species of human gut microbes and its evaluation based on short-chain fatty acids fermentation profiles. Biosci. Biotechnol. Biochem. 81: 2009-2017.
- Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., Patterson, P.H. & Mazmanian, S.K. 2013. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. Cell 155: 1451-1463.
- Kitada, Y., Muramatsu, K., Toju, H., Kibe, R., Benno, Y., Kurihara, S. & Matsumoto, M. 2018. Bioactive polyamine production by a novel hybrid system comprising multiple indigenous gut bacterial strategies. Sci. Adv. 4: eaat0062.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Meta, H.I.T.C., Bork, P., Ehrlich, S.D. & Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 464: 59-65.
- Sakanaka, M., Hansen, M.E., Gotoh, A., Katoh, T., Yoshida, K., Odamaki, T., Yachi, H., Sugiyama, Y., Kurihara, S., Hirose, J., Urashima, T., Xiao, J.z., Kitaoka, M., Fukiya, S., Yokota, A., Leggio, L.L., Hachem, M.A. & Katayama, T. 2019. Evolutionary adaptation in fucosyllactose uptake systems supports bifidobacteria-infant symbiosis. Sci Adv 5: eaaw7696.
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C.A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E. & Elinav, E. 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. Nature **514**: 181-186.
- Sugiyama, Y., Nakamura, A., Matsumoto, M., Kanbe, A., Sakanaka, M., Higashi, K., Igarashi, K., Katayama, T., Suzuki, H. & Kurihara, S. 2016. A Novel putrescine exporter SapBCDF of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **291**: 26343-26351.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. & Gordon, J.I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444: 1027-1031.
- Yamamoto-Osaki, T., Kamiya, S., Sawamura, S., Kai, M. & Ozawa, A. 1994. Growth inhibition of *Clostridium difficile* by intestinal flora of infant faeces in continuous flow culture. J. Med. Microbiol. 40: 179-187.

Gifu 嫌気性培地を用いたヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種の培養 および短鎖脂肪酸発酵特性に基づくその評価

後藤 愛那, 阪中 幹祥, 片山 高嶺, 栗原 新

石川県立大学生物資源環境学部寄付講座腸内細菌共生機構学 〒921-8836 石川県野々市市末松1-308

Use of Gifu Anaerobic Medium for culturing 32 dominant species of human gut microbes and its evaluation based on short-chain fatty acids fermentation profiles. Aina Gotoh, Mikiyasu Sakanaka, Takane Katayama, Shin Kurihara

Host-Microbe Interaction Research Laboratory Faculty of Bioresources and Environmental Sciences Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

Recently, a "human gut microbial gene catalogue", which ranks the dominance of microbe genus/species in human fecal samples, was published. Most of the bacteria ranked in the catalogue are currently publicly available; however, the growth media recommended by the distributors vary among species, hampering physiological comparisons among the bacteria. To address this problem, we evaluated Gifu Anaerobic Medium (GAM) as a standard medium. Forty-four publicly available species of the top 56 species listed in the "human gut microbial gene catalogue" were cultured in GAM, and out of these, 32 (73%) were successfully cultured. Short-chain fatty acids from the bacterial culture supernatants were then quantified, and bacterial metabolic pathways were predicted based on *in silico* genomic sequence analysis. Our system provides a useful platform for assessing growth properties and analyzing metabolites of dominant human gut bacteria grown in GAM and supplemented with compounds of interest.

Key words: gut microbes, standard medium, short-chain fatty acids, dominant human gut bacteria, Gifu anaerobic medium

E-mail:

後藤愛那(aina.g1985@gmail.com)(現所属:京都大学大学院生 命科学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町), 阪中幹祥 (miksak@dtu.dk) (現所属: National Food Institute, Technical University of Denmark. Kemitorvet 2800 Kgs. Lyngby), 片山高嶺(takane@lif.kyoto-u.ac.jp)(現所属:京都大学大学院生 命科学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町), 栗原 新 (skurihara@waka.kindai.ac.jp) (現所属:近畿大学生物 理工学部 〒 649-6433 和歌山県紀の川市西三谷 930) 共同研究者 杉山友太(石川県立大学生物資源環境学部). 奈良未沙希 (石川県立大学生物資源環境学部), 南 博道(石川県立大学生物資源工学研究所), 谷内寬之(石川県立大学生物資源環境学部), 北方 彩(石川県立大学生物資源環境学部). 中川 明(石川県立大学生物資源工学研究所), 奥田修二郎 (新潟大学大学院医歯学総合研究科), 加藤紀彦(京都大学大学院生命科学研究科)

緒 言

過去10年間に行われた疫学的研究および複数のオミクス研究(ゲノミクス,プロテオミクス,およびメタボロ ミクス)により,腸内常在菌叢およびその代謝産物が宿 主であるヒトの健康に影響を与えることが示唆された. 例えば,腸内常在菌叢は,消化管の発達,食物の消化と 変換,宿主の免疫反応,宿主のエネルギー収支に影響を 与え,炎症性腸疾患にも関与していることがわかってい る(Gevers *et al.*, 2014; Honda & Littman, 2012; Hooper *et al.*, 2002; Peterson *et al.*, 2008; Sommer & Backhed, 2013; Spor *et al.*, 2011; Turnbaugh *et al.*, 2009).現在,この分 野における研究の焦点は、オミクス研究から代謝産物に 基づく研究へと移行しており、腸管内腔における共生に おいて重要な役割を果たす分子(例えばアミノ酸,ペプ チド、ビタミン、ポリアミン、バクテリアによって産生 される短鎖脂肪酸など)について研究が行われ始めてい る (Donia & Fischbach, 2015; El Kaoutari et al., 2013; Flint et al., 2008: Matsumoto et al., 2013: Wovke et al., 2006). このうち, 短鎖脂肪酸は以下に列挙するように, ヒト健康に好影響を与える腸内細菌の代謝産物として期 待されているために、近年大きな注目を集めている. 短鎖脂肪酸は腸管粘膜を構成する細胞の主要なエネル ギー源であり、肥満やメタボリックシンドロームを防ぎ、 抗炎症作用や抗結腸直腸癌作用を持つほか、細菌由来の 毒素から宿主を保護し、不安行動を調節する (Arora et al., 2011; Berni Canani et al., 2012; Csordas, 1996; Fukuda et al., 2011; Fukuda et al., 2012; Furusawa et al., 2013; Hamer et al., 2008; Hosseini et al., 2011; Louis et al., 2014; Murphy et al., 2010; Murugesan et al., 2015; Perry et al., 2016; Shepherd et al., 2014; Turnbaugh et al., 2006; Vinolo et al., 2011). これらの代謝産物の腸内細菌による産生 および合成が、どのように制御されているかは、依然と して未解明である.

2010年に124人の被験者の糞便中に見いだされた優 勢な腸内常在菌の属および種が同定され、「ヒト腸内常 在菌叢における遺伝子カタログ」として報告された (Qin et al., 2010). このカタログから決定されるヒト腸内常在 細菌最優勢種を再構成すれば、優勢でない菌種を無視し てしまう危険をはらむものの, in vitro で代謝産物の挙動 を解析することが可能となる.また、2010年の調査で確 認されたヒト腸内常在菌叢最優勢種の大部分(56種中 44種)が. Japan Collection of Microorganisms (JCM). American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) を通じて購入可能であった. しかし,これらの菌株保存・ 分譲機関が推奨する培地(Table 1)は種によって異なり、 多くの場合、その調製には面倒な手順が必要である、例 えば, ATCC 培地 1016の作成には、牛ルーメン液といっ た入手困難な材料が作成に必要である. さらに, ヒト腸 内常在菌叢最優勢種を構成するそれぞれの細菌種を培養 するための培地は、その構成成分がそれぞれ異なるため に、各菌種の代謝挙動および増殖について、適切に比較 を行うことが不可能である.

腸内細菌の培養においては、Gifu嫌気性培地(GAM; 1.0% (w/v) peptic digest of animal tissue, 0.3% papaic digest of soybean meal, 1.0% proteose peptone, 1.35% digested serum, 0.5% yeast extract, 0.22% beef extract, 0.12% liver extract, 0.3% glucose, 0.25% potassium dihydrogen phosphate, 0.3% sodium chloride, 0.5% soluble starch, 0.03% L-cysteine hydrochloride, and 0.03% sodium thioglycollate, final pH 7.3 ± 0.1) (Yamamoto-Osaki et al., 1994)が実験的に有用であるこ とが知られている. ヒト腸内常在菌叢最優勢種のうち JCM から分譲される菌種については GAM での生育の可 否が調べられているが, ATCC と DSMZ に分譲される 菌種については GAM による生育の可否が調べられてい ない. そこで,我々は,GAM が優勢なヒト腸内細菌の ための共通の培地として利用可能かどうかを評価した. このことは,ヒト腸内常在菌叢最優勢種を培養するため に現在使用されている培地に関連する上記の問題の解決 につながる.

ここでは、「ヒト腸内微生物遺伝子カタログ」に掲載 されている公に入手可能な44種のうち32種がGAMで 培養できることを示す.さらに、我々は、細菌によって 産生された短鎖脂肪酸(乳酸、酢酸、プロピオン酸、お よび酪酸)の濃度を分析した.次に、それらのゲノム配 列の *in silico*分析による予測に基づいて、これらの細菌 の短鎖脂肪酸代謝経路について議論した.

実験方法

溶存酸素を除去した GAM の調製

日水製薬(Tokyo, Japan)から購入した GAM ブイヨ ンを脱イオン水に完全に溶解し、115 \mathbb{C} で 15 分間オート クレーブ処理することで減菌した.オートクレーブの温 度が 97 \mathbb{C} に下がったら、直ちに GAM を嫌気チャンバー (INVIVO₂ 400, Baker Ruskinn, Sanford, ME, USA)内に移 し、37 \mathbb{C} で一晩放置して溶存酸素を除去した.腸内細菌 の培養における全ての操作は嫌気チャンバー内で行った.

推奨培地と GAM での腸内細菌の培養

腸内細菌はATCC, JCM, および DSMZ から入手した (Table 1). GAM 以外の菌株保存分譲機関による推奨培 地は、菌株保存分譲機関による手法に従い調製した.ま ず,細菌を調製した推奨培地(Table 1)を用いて,37℃, 嫌気性条件下(0%O₂,5%H₂,10%CO₂, and 85%N₂) で1~5日間,培養した.次いで,推奨培地中で増殖し た細菌培養液を、酸素を除去した滅菌済みグリセロール と混合し (グリセロールの終濃度は15% (v/v)), -80℃ で保存したものをグリセロールストックとした.次に, 作成したグリセロールストック中の細菌を、滅菌爪楊枝 を用いて GAM に接種した. 他の細菌がコンタミネーショ ンした可能性については、後述する 16S rDNA 配列解析 により排除した. GAM を用いた細菌培養液を,酸素を 除去した滅菌済みグリセロール(終濃度は15% (v/v)) と混合し、96ウェルプレートに等分し、-80℃で保存 した. グリセロールの酸素除去は、GAMの脱酸素化と 同様に行った.

Rank ^a	Species	Strain	Recommended medium ^b	Growth in	Growth in
				GAM	MegaMedium
					1.0(Wu et al., 2015)
1	Bacteroides uniformis	JCM 5828	JCM medium 13, EG, <u>GAM</u>	+	+
2	Alistipes putredinis	JCM 16772	EG	—	n/a ^c
3	Parabacteroides merdae	JCM 9497	EG	+	n/a
4	Dorea longicatena	DSM 13814	DSM medium 104	+	+
5	Ruminococcus bromii	ATCC 27255	ATCC medium 1016	—	n/a
6	Bacteroides caccae	JCM 9498	EG	+	+
8	Bacteroides thetaiotaomicron	JCM 5897	JCM medium 12, <u>GAM*</u>	+	+
9	Eubacterium hallii	ATCC 27751	ATCC medium 1869, 260	-	n/a
10	Ruminococcus torques	ATCC 27756	ATCC medium 1589, 260	+	n/a
14	Ruminococcus lactaris	ATCC 29176	ATCC medium 1490, 260	+	n/a
15	Collinsella aerofaciens	JCM 7790	EG	+	+
16	Dorea formicigenerans	ATCC 27755	ATCC medium 158, 260, <u>735*</u>	+	n/a
17	Bacteroides vulgatus	JCM 5826	JCM medium 13, EG, GAM	+	+
18	Roseburia intestinalis	DSM 14610	DSM medium 330	+	n/a
20	Eubacterium siraeum	ATCC 29066	ATCC medium 1016	+	n/a
21	Parabacteroides distasonis	JCM 5825	JCM medium 13, EG, GAM	+	+
23	Bacteroides ovatus	JCM 5824	JCM medium 13, EG, GAM	+	+
26	Eubacterium rectale	JCM 17463	JCM medium 465	_	n/a
27	Bacteroides xylanisolvens	JCM 15633	EG, JCM medium 461	+	n/a
28	Coprococcus comes	ATCC 27758	ATCC medium 1102	+	n/a
31	Eubacterium ventriosum	ATCC 27560	ATCC medium 1528, <u>1589*</u>	+	n/a
32	Bacteroides dorei	JCM 13471	EG	+	n/a
33	Ruminococcus obeum	DSM 25238	DSM medium 104	+	+
34	Subdoligranulum variabile	DSM 15176	DSM medium 339a	_	n/a
35	Pseudoflavonifractor capillosus	ATCC 29799	ATCC medium 1490, 260, GAM*	+	n/a
36	Streptococcus thermophilus	JCM 17834	JCM medium 13, <u>28</u> , 156, 282	—	n/a
37	Clostridium leptum	ATCC 29065	ATCC medium 2751, 260	—	n/a
38	Holdemania filiformis	DSM 12042	DSM medium 104	_	n/a
39	Bacteroides stercoris	JCM 9496	EG	+	n/a
40	Coprococcus eutactus	ATCC 27759	ATCC medium 1015, 260, <u>735*</u>	—	n/a
42	Bacteroides eggerthii	JCM 12986	EG	—	n/a
43	Butyrivibrio crossotus	DSM 2876	DSM medium 330	_	n/a
44	Bacteroides finegoldii	JCM 13345	EG	+	n/a
45	Parabacteroides johnsonii	JCM 13406	EG	+	n/a
47	Clostridium nexile	ATCC 27757	ATCC medium 1490	+	n/a
48	Bacteroides pectinophilus	ATCC 43243	ATCC medium 1547, 260	_	n/a
49	Anaerotruncus colihominis	JCM 15631	EG, JCM medium 676	+	n/a
50	Ruminococcus gnavus	ATCC 29149	ATCC medium 1490, 260	+	n/a
51	Bacteroides intestinalis	JCM 13265	EG	+	n/a
52	Bacteroides fragilis	JCM 11019	EG	+	n/a
53	Clostridium asparagiforme	DSM 15981	DSM medium 104b	+	n/a
54	Enterococcus faecalis	ATCC 700802	ATCC medium 44, <u>MRS*</u>	+	n/a
55	Clostridium scindens	JCM 6567	EG	+	+
56	Blautia hansenii	JCM 14655	JCM medium 676	+	n/a

Table 1. List of bacterial species/strains and description of the media used for culture.

^aRank order established in the "human gut microbial gene catalogue"(Qin *et al.*, 2010) ^bMedium recommended by microbial resource collections. Underlined medium was used for recovery and storage. Media noted with

asterisks (*) were used although they are not recommended by the resource collections. "There was no description about growth in reference(Wu *et al.*, 2015).

GAM を用いた場合の腸内細菌の増殖曲線

GAM に腸内細菌培養液のグリセロールストックを嫌 気チャンバー内で完全に融解させ、このうちの5µLを 96 穴ディープウェルプレート中の 500 µLの GAM に混 合し, 嫌気条件で37℃で1-2日間, 前培養した. コピー プレートスタンド(Tokken, Chiba, Japan)を用いて、 前培養液を96 穴ディープウェルプレート中の500μLの GAMに接種した.以下のプロトコルによりOD₆₀₀を測 定することにより各菌種の増殖を経時的に解析した. 96 穴ディープウェルプレートで増殖した培養液をピ ペッティングにより混合し、一部を取り出して OD con を 測定した.1cmの光路長を有するキュベット中で測定 して得られた培養液(適切に希釈済み)のOD₆₀₀値を, 未知の光路長を有する96穴プレート中のマイクロプ レートリーダーにより測定された同じサンプルの 600nmにおける吸光度で割った。得られた値を、マイ クロプレートリーダーによって得られた生データから OD600値を計算するための係数として使用した. 培養の 終わりに,細胞をペレット化し,培養においてコンタミ ネーションがなかったことを確認するために後述の16S rDNAの配列決定を行った。後にpH および短鎖脂肪酸 を解析する目的で、培養上清を-30℃で保存した.

16S rDNA シーケンス

ゲノム DNA (gDNA) をビーズショッカー[Shake Master ver. 1.2 (#BMS-12, Biomedical Science, Tokyo, Japan)] あ るいはフェノール-クロロホルム抽出により抽出し、16S rRNA遺伝子中(16S rDNA)のV1-V3領域のDNA配列 決定に供した.以下に手法の概略を示した. 16S rRNA (1,500 塩基対)をコードする DNA 断片を、プライマー 7f (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') およびプライマー 1510R (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')を用いた PCR によって gDNA から増幅した. 精製した DNA 断片を プライマー 518R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3')を 用いた DNA 配列決定のための鋳型として使用した.得 られた配列をヌクレオチド基本局所アラインメント検索 ツール (BLAST) プログラム (https://blast.ncbi.nlm.nih. gov/Blast.cgi)を用いて分析した。培養物の純度を確認 するために、サンガー配列決定中のヌクレオチド配列を 表す波形を視覚的に検査することで単一のシグナルから なることを確認した.得られた配列について BLAST 解 析を行い,目的の細菌の16S rDNA 配列がトップヒット であれば、培養が成功したと判定した. Parabacteroides distasonis $3 \downarrow U$ Pseudoflavonifractor capillosus $02 \circ 0$ 種については、その16S rDNA 配列は各種内で多型であ るために、16SrDNA 配列をプラスミドベクターにク ローニングし、得られた10個のプラスミドを各株につ

いて配列決定し,続いて BLAST 分析を行った.検索結 果が目的の細菌の 16S rDNA 配列のみであった場合に, 培養が成功したと判定した.

短鎖脂肪酸の定量

短鎖脂肪酸の濃度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC)分析によって測定した.GAMで培養した細胞 を4℃で40分間,4,400rpmで遠心した.得られた培養 上清を水で300倍希釈し,そのうちの10 μ LをAC11-HC (4 by 250mm)カラムを装備したDionex ICS-3000シス テム(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)を用いて分析した. 分析に先立って、カラムに1mM水酸化ナトリウム(溶 媒A)を1.5mL/minの流速で流すことで系を平衡化し た.サンプル中の各成分は、溶媒Aおよび100mM水酸 化ナトリウム(溶媒B)を用いて二成分勾配により溶出 した.1.5mL/minの流速で、0~8minで0%の溶媒B, 8~15minで0~10%の溶媒B,その後15~25minで 59%の溶媒Bをそれぞれ溶媒Aに混入させ、グラジエ ントを形成させた.

Blast を使用した in silico 代謝経路解析

Protein BLAST (Blastp) (Camacho *et al.*, 2009) 分析は, NCBI protein searches データベース中のヒト腸内常在 菌叢最優勢種のタンパク質配列に対して,参照タンパク 質配列 (Table 2) を検索した. 100 および 300 bit を超 えるスコアを有するタンパク質を抽出した.

結 果

ヒト腸内常在菌叢最優勢56種にランキングされる各細 菌種の増殖

「ヒト腸内微生物遺伝子カタログ」のトップ56にラン ク付けされた細菌のうち、44種(79%)がATCC、 JCM, および DSMZ から入手可能であった (Table 1). 上記の3つの菌株・分譲機関によるマニュアルでは、こ れらの44種のうち、4種(9%)について GAM で培養 すること,残り(91%)については,Table1に記載の 特定の培地で培養することがそれぞれ推奨されていた (購入後の各菌種の回復培養および保存にはTable 1の 下線で示した培地を使用した). アスタリスク(*)で 示された6菌種は、Table 1で示した培地で培養可能で あることが我々の研究室で以前に確認されていたので, 推奨培地とは異なる培地で培養を行った。各培地に接種 した細菌は、37℃に保った嫌気チャンバー内で1~5日 間培養した.得られた培養液からgDNAを抽出し、そ の後, 16S rDNA 配列を決定することで、コンタミネー ションがないことを確認した.

	Source	Accession ID	Reference
Lactic acid synthesis			
(1) D-lactate dehydrogenase (D-LDH)	Bacteroides thetaiotaomicron	NP_810488	Uniprot*
(2) L-lactate dehydrogenase (L-LDH)	Enterococcus faecalis	NP_814049	Uniprot
Acetic acid synthesis			
(3) acetate kinase (AcK)	Bacteroides thetaiotaomicron	NP_812604	Uniprot
Propionic acid synthesis			
(4) propionate kinase (ProK)	Clostridium neopropionicum	KXL51791	Uniprot
(5) propionyl-CoA:succinate CoA transferase	Escherichia coli	WP_061359559	(Haller et al.,
(PCoAT)			2000)
(6) methylmalonyl-CoA decarboxylase (MmdA)	Veillonella parvula	ACZ24924	(Reichardt et al.,
			2014)
(7) lactoyl-CoA dehydratase (LcdA)	Clostridium propionicum	AEM62994	(Reichardt et al.,
			2014)
(8) CoA-dependent propionaldehyde dehydrogenase	Roseburia inulinivorans	ABC25529	(Reichardt et al.,
(PduP)			2014)
Butyric acid synthesis			
(9) butyrate kinase (ButK)	butyrate-producing bacterium	AAR19758	(Louis et al.,
			2004)
(10) butyryl-CoA:acetate CoA-transferase (BCoAT)	Roseburia sp. A2-183	AAX19660	(Charrier et al.,
			2006)

Table 2. List of proteins used as the query sequences for Blastp analysis.

* Protein sequence data were obtained from "Uniprot" (http://www.uniprot.org/)

推奨培地における前培養の後,前培養液をGAMに接種し、37℃に保った嫌気チャンバー内で1~5日間培養した.検討した種のうち,推奨培地で培養した28種がGAMにおいても増殖することができた(Table 1). GAMで培養した培養液中に含まれる細菌の16S rDNA配列を解析することで,培養がコンタミネーションなく行われたことを確認した.

この結果,「ヒト腸内微生物遺伝子カタログ」で特定 されたヒト腸内常在菌最優勢種のうち公に入手可能なも のは44種であるが,この中で合計32種(73%)がGAM で培養可能であることが明らかとなった.これは,「ヒト 腸内微生物遺伝子カタログ」でランク付けされている上 位 56 種の半分以上(32 種, 57%)に相当する(Table 1).

GAM で培養可能なヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種の増殖 曲線

GAM で培養した際のヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種の 増殖曲線を Fig.1 に示した.1日以内にほぼ全ての種(27 種)が定常期に入った.Bacteroides 門に分類される腸内 細菌種は,GAM の生育が特に良好である傾向がみられ た.定常期における最大 OD₆₀₀ 値および増殖曲線の形状 は種ごとに異なった.


Figure 1. Growth curve of dominant human gut bacteria in GAM. Growth was monitored by measuring OD_{600} at 37 °C for 60 h under anaerobic conditions. The numbers before the name of the species indicate the rank order.

Continued on the next page.



Figure 1. continued

Continued.

Continued on the next page.



Continued.

Continued on the next page.



Figure 1. continued

Continued.

GAM で培養可能なヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種によって産生された短鎖脂肪酸の分析

本研究で開発された GAM を用いた培養が物質生産に 関わる機能遺伝子の解析に有用であることを示す目的 で, GAM で培養可能なヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種の 培養60時間における培養上清における短鎖脂肪酸(乳酸, 酢酸, プロピオン酸, および酪酸)の濃度(Fig.2) および pH(Fig.3)を測定した.

32種のうち6種(18.8%)が10mMを超える乳酸を産 生し,他の26種の乳酸産生量は低レベルにとどまった





SCFAs (lactic acid, acetic acid, propionic acid, and butyric acid) in culture supernatants after 60h of culture of the dominant human gut bacteria. The number before the name of the species indicates the rank order listed in the "human gut microbial gene catalogue". Dashed lines on the panel of lactic acid and acetic acid show the concentration of each acid originally contained in GAM.

(Fig.2). この中で*E. faecalis*は,最も高い濃度の乳酸を 産生した. 試験した全ての種の培養上清中に酢酸が検出 された. GAM で培養した場合22種(71%)が10mM を 超える濃度の酢酸を産生した.GAM で良好な生育を示し たほとんどの *Bacteroides* 属細菌と *Parabacteroides* 属細菌 は、かなりの量の酢酸を産生した(Fig.2). 試験に供し た Bacteroides 属と Parabacteroides 属に含まれるすべて の菌種はプロピオン酸を産生した (Fig.2). Clostridiales 目に属する Roseburia intestinalis, Coprococcus comes, Anaerotruncus colihominis, Eubacterium ventriosum の4



Figure 3. Summary of growth, pH, and composition of SCFAs in culture supernatants.

The OD_{600} and pH values of culture supernatants after culture for 60 h in GAM. Total SCFAs indicate the sum of the concentrations of lactic acid, acetic acid, propionic acid, and butyric acid contained in culture supernatant. The number of each column and the number before the name of the species indicate the rank order.

種の培養上清からは酪酸が検出された.

考 察

ポストマイクロビオーム時代の研究では、ヒト常在菌 叢最優勢種の生菌を用いたアッセイが重要であり、この ためには網羅的な腸内細菌の培養が必須である.しかし ながら、優勢なヒト腸内細菌を培養するために菌株保存・ 分譲機関によって推奨される培地の作成には煩雑な手順 が要求される上に、各培地にはそれぞれ異なった培地成 分が含まれるため、これらの培地で生育したそれぞれの 細菌の代謝産物を種間で比較することは困難である.本 研究では、培地の調製の困難さを軽減し、代謝産物分析 を視野に入れた場合の培地を共通化する目的で、ヒト腸 内常在菌叢最優勢種を培養するための標準培地としての GAM を位置づけ、その有用性を検証した.

Wu *et al.* (2015) は、ヒト腸内細菌叢モデルのモデル を確立するための標準培地として Megamedium 1.0 を開 発し、「ヒト腸内微生物遺伝子カタログ」に記載されて いる 10 種のヒト腸内常在菌叢最優勢種を含む 13 種を培

養したが、本研究では、これら10種はGAMで培養可 能であった(Table 1). 26 種類の成分を必要とする Megamedium 1.0 と比較して, GAM は粉末を水に溶か すことによって簡単に調製することができる.本研究で は、ヒト腸内常在菌叢最優勢種のかなりの割合に相当す る 32 種を GAM で培養可能なことが示された. GAM に は、他の一般的に利用されている腸内細菌用の培地より も優れた点がいくつかある.たとえば、多くの腸内細菌 用の培地に添加されるウマの血液は、GAM には必要と されないために、培地は透明であり、OD₆₀₀を指標とし た増殖を容易に解析できる.また,GAMを標準培地と して培養することにより, 短鎖脂肪酸をはじめとした代 謝産物の解析が可能となり、複数の腸内細菌種の培養に 用いる培地が共通であることは、細菌代謝や様々な増殖 条件に対する応答を培地のバイアスのない条件で比較す ることが可能となる.

短鎖脂肪酸はいくつかの経路で産生される. Fig.4 に グルコースを炭素源とした場合の乳酸, 酢酸, プロピオ ン酸, 酪酸の合成経路の概要 (Louis *et al.*, 2014; Reichardt *et al.*, 2014; Rios-Covian *et al.*, 2015) を示し, Fig.5 に



Figure 4. Pathways responsible for the biosynthesis of SCFAs from glucose in gut microbes. The key enzymes are indicated: (1, 2) LDH, lactate dehydrogenase; (3) Ack, acetate kinase; (4) ProK, propionate kinase; (5) PCoAT, propionyl CoA:succinate CoA transferase; (6) MmdA, methylmalonyl CoA decarboxylase; (7) LcdA, lactoyl-CoA dehydratase subunit alpha; (8) PduP, CoA-dependent propionaldehyde dehydrogenase; (9) ButK, butyrate kinase; and (10) BCoAT, butyryl CoA:acetyl CoA transferase.

GAM で培養可能であったヒト腸内常在菌叢最優勢種に おける,短鎖脂肪酸代謝に関連する重要な酵素あるいは そのホモログのゲノム上における存在を示した.

乳酸は、主に乳酸脱水素酵素(LDH)によってピルビン酸から産生される(Fig.4).本研究で試験した32菌種のうち、25の種が高度に保存されたLDHホモログを有するにもかかわらず(Fig.5)、乳酸産生量は低レベルにとどまった(Fig.2).一般的な嫌気性条件下での効率的な解糖には、LDHによって触媒される反応において

形成される NAD⁺ が必要である.したがって,多くの嫌 気性細菌が乳酸をあまり生産しなかったことは,驚くべ きことである. B. uniformis と B. intestinalis の培養上清 には高濃度の乳酸が含まれていたが,これら2種の増殖 は,試験を行った他の Bacteroides 属細菌の増殖と比較 して低レベルであった(Fig.2).このことは,生育に伴っ て放出された高濃度の乳酸が, B. uniformis および B. intestinalis の生育を阻害した可能性を示唆している.

酢酸は主にピルビン酸からアセチル CoAを介して生



Figure 5. Occurrence of homologous proteins responsible for SCFA synthesis from glucose in the genomes of dominant human gut bacteria.

The results shown are based on the Blastp analysis of genomes in the NCBI database. The color of each columns indicates the score from the Blastp analysis: (black) > 300 bit, (grey) 100-300 bit, and (white) < 100 bit. The number before the name of the species indicates the rank order listed in the "human gut microbial gene catalogue".

産される. 酢酸キナーゼ(AcK)(Fig.4)(Louis et al., 2004)は, 酢酸産生経路の最終段階の化学反応を触媒す る酵素であり,ヒト腸内常在菌叢最優勢種に含まれる各 細菌のゲノムに広く保存されている(Fig.5).ビフィズ ス菌は、プロバイオティクス細菌として用いられる菌種 であるが、本菌に由来する酢酸はマウスの腸上皮に吸収 され、大腸菌 O157:H7(Fukuda et al., 2011)などの病原 菌に対する防御機構を増強することがこれまでに報告さ れている.本研究で試験したヒト腸内常在菌叢最優勢 32種のうち, R. intestinalis および E. ventriosum を除く 30菌種の培養上清中に5mMを超える、かなり高濃度の 酢酸が検出された.この結果は、ヒト腸内常在菌叢最優 勢種の多くが、ビフィズス菌と同様に腸上皮に酢酸を供 給し、腸上皮細胞の防御機構に寄与していることを示唆 している.

本研究では、試験した株の22%に相当する7菌種の ヒト腸内常在菌叢最優勢種が、5mM以上のかなり高い 濃度のプロピオン酸を生産した.これら7菌種は、プロ ピオン酸の生合成を触媒するメチルマロニル-CoA デカ ルボキシラーゼ (MmdA) とプロピオニル CoA: コハ ク酸CoAトランスフェラーゼ(PCoAT)の両方の遺伝 子ホモログを有していた (Fig.5). MmdA は, グルコー スからプロピオン酸を生成するための主要経路であるコ ハク酸経路に含まれる酵素であり、コハク酸経路の最終 段階は、PCoATに触媒されるプロピオニル CoA からコ ハク酸へのCoAの転移反応である (Fig.4). 他のプロ ピオン酸産生経路としては、ラクトイル-CoAデヒドラ ターゼ(LcdA)を用いるアクリル酸経路および CoA 依 存型プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ (PduP) を用いるプロパンジオール経路が知られている(Fig.4) (Reichardt et al., 2014). アクリル酸経路の最終反応では, リン酸アセチルトランスフェラーゼによってプロピオニ ル CoA ヘリン酸が転移され、プロピオニルリン酸が形 成された後に、プロピオン酸キナーゼ (ProK) によって プロピオン酸が生成する (Fig.4) (Hosseini et al., 2011). 一方で、プロパンジオール経路では、PCoATとProKに よって触媒される反応が、それぞれ最終ステップになる 可能性がある (Reichardt et al., 2014). ProK を参照配列 として使用した Blastp 解析により検索されたタンパク 質配列は、AcKを参照配列として使用した Blastp 解析 により検索されたタンパク質配列と全ての菌種において 完全に一致していた。過去の研究においてアセチルリン 酸を脱リン酸化する反応と、プロピオニルリン酸を脱リ ン酸化する反応は、同じキナーゼによって触媒されるこ とが示されている (AcK/ProK) (Chittori et al., 2012; Diez-Gonzalez et al., 1996; Hesslinger et al., 1998). しか しながら、Firmicutes 門および Actinobacteria 門に分類 される種の培養上清中からはプロピオン酸が検出されな かった (Fig.2). これらの門に分類されるほとんどす べての種はAcK/ProK,およびMmdA, LcdA, または PduPホモログを有したが、それらのすべてはPCoATホ モログを欠いていた.

本研究で R. intestinalis, C. comes, A. colihominis, E. ventriosum の培養上清中に検出された酪酸は、2分子の アセチル CoA から酪酸キナーゼ (ButK)の触媒する反応 により生成するか、ブチリル CoA:アセチル CoAトラ ンスフェラーゼ(BCoAT)の反応によって生成すると考 えられる (Duncan et al., 2002). このうち、ヒト糞便か ら分離された C. comes, A. colihominis, E. ventriosum については、ButK が酪酸合成に寄与することがこれま でに報告されている (Duncan *et al.*, 2002). 一方で. R. intestinalis では ButK ではなく BCoAT が酪酸の生合成に 関与することが知られている (Duncan et al., 2002). R. intestinalis の培養上清からは最も高濃度の酪酸が検出さ れ、これに伴い BCoAT 経路で利用される培養上清中の 酢酸は低濃度であった. 一方, E. faecalis, C. aerofaciens, およびすべての Bacteroides 属細菌の培養上清には、こ れらの菌種が ButK ホモログを有しているにも関わら ず, 酪酸が検出されなかった. また, BCoATホモログ を持つ P. capillosus についても酪酸の生成は認められな かった.

最近, Clostridium 属腸内細菌に由来する酪酸およびプ ロピオン酸が,結腸調節性T細胞の誘導を介してマウス の結腸の炎症を抑制するのに重要な役割を果たすことが 報告された (Furusawa et al., 2013).本研究において試験 された2種の Clostridium 属細菌である C. asparagiforme および C. scindens はプロピオン酸を生成した.また, 本研究で対象とした32株のうち7株はプロピオン酸を 生産し,4株は酪酸を生産した.これらの結果は、ヒト 腸内常在菌叢最優勢種の一部が、免疫調節機能を有し、 宿主と腸内細菌との間の共生関係にとって重要であり得 る短鎖脂肪酸の産生を通して腸内環境を調節することを 示している.

本研究における短鎖脂肪酸解析の結果は、先行研究に おける生化学的解析および本研究におけるヒト腸内常在 菌叢最優勢種の染色体に対する *in silico* 解析の結果と一 致している (Louis *et al.*, 2014).本研究における短鎖脂 肪酸産生細菌は短鎖脂肪酸産生に関与する遺伝子または それらのホモログを有することから、本研究で得られた 結果は、これまでに行われたヒト腸内細菌における短鎖 脂肪酸関連代謝経路が同定された以前の *in vitro* におけ る酵素研究における結果と一致している.しかしながら、 短鎖脂肪酸合成に関与する遺伝子またはそれらのホモロ グを有するいくつかの細菌は、本研究では、それぞれの 遺伝子に対応する短鎖脂肪酸を産生しなかった.例えば Bacteroides 属の細菌はすべて ButK ホモログを持ってい るが (Fig.5), 酪酸を生成するものはなかった (Fig.2). これらの結果は,特定の化合物の存在,宿主の免疫系, および他の細菌の存在などの他の要因が, Bacteroides 属 細菌における butK の発現に必要であることを示唆して いる.これらの因子は,本研究で開発されたシステムを 用いた包括的な in vitro スクリーニングによって同定さ れうる.

我々のシステムは、標準培地として GAM を使用する ことで、ヒト腸内常在菌叢最優勢種の増殖特性およびそ の代謝産物を再現性良く分析するための有用なプラット フォームである.この研究で採用されたアプローチは、 ヒト腸内常在菌叢最優勢種の代謝挙動を理解するための モデルとして使用することが可能である.また、本研究 で開発されたシステムが、培養と代謝産物の解析を通じ た腸内細菌とヒト宿主間との共生関係を解析する研究に おいて広く用いられることを望む.

要 約

近年,培養を介さない手法によりヒト腸内細菌最優勢 56種が報告された.これらの56菌種のうち44種につい てはその基準株が菌株保存・分譲機関から入手可能であ る.しかし,菌株保存・分譲機関による推奨培地は菌種 間で様々であるためにヒト腸内細菌最優勢種同士の生理 学的な比較が困難である.また,推奨培地の多くは作成 法が煩雑で,牛ルーメン液などの入手困難な材料を必要 とするものも多い.この問題を解決するために本研究で は,腸内細菌培養培地として知られるGifu Anaerobe Medium (GAM)を標準培地として用い,ヒト腸内細 菌最優勢種の生育の可否を調べた.さらに,ヒト腸内細 菌最優勢種の生理機能を比較する際の標準培地としての GAMの実用性を示す目的で,腸内細菌の有用代謝産物 として知られる短鎖脂肪酸についての解析を行った.

腸内細菌最優勢56種のうち、菌株保存・分譲機関か ら入手可能な44種を推奨培地で培養し、グリセロール ストックにて保存した後にGAM 培地での生育の可否を 96 穴ディープウェルプレート上で調べた.生育した菌 体について16S rDNA シーケンスにより培養液中の大部 分が目的の菌種であることを示した.試験を行った44 菌種のうち32種がGAM で培養可能であり、これは最 優勢56種の57%、入手可能な44種の79%であった. 次に、これらの菌種の培養上清由来の短鎖脂肪酸(乳酸、 酢酸、プロピオン酸、酪酸)を定量した.6菌種が乳酸を、 22 菌種が酢酸をそれぞれ10mM 以上の濃度で生産した. また、試験した Bacteroides 属および Parabacteroides 属 細菌の全てに相当する14 菌種がプロピオン酸を、4 菌種 (Roseburia intestinalis, Coprococcus comes, Anaerotruncus colihominis, Eubacterium ventriosum)が酪酸を生産した. これらの短鎖脂肪酸が検出された菌種について、その代 謝経路を in silico 予測したところ、既存の研究結果と合 致していた.本研究で開発した96 穴プレート上のGAM を用いた培養システムは、ヒト腸内細菌最優勢種の増殖 の評価や、代謝産物の分析を行う際に再現性の良いプ ラットフォームとして用いることが可能である。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 後藤愛那,奈良未沙希,杉山友太,阪中幹祥,谷内寛之, 北方彩,奥田修二郎,片山高嶺,栗原新.2017.GAM培 地を用いたヒト腸内細菌最優勢32種の培養及び短鎖脂肪 酸の生産能とその代謝経路のin silico予測.日本農芸化学 会大会2017年度大会.3月19日.京都.
- 2)後藤愛那,奈良未沙希,杉山友太,阪中幹祥,谷内寛之, 北方彩,中川明,南博道,奥田修二郎,加藤紀彦,片山 高嶺,栗原新.2017. GAMを用いたヒト腸内細菌最優勢32 種の培養と短鎖脂肪酸産生プロファイルに基づくその評 価.第10回北陸合同バイオシンポジウム.11月10日.富 山.

原著論文

 Gotoh, A., Nara, M., Sugiyama, Y., Sakanaka, M., Yachi, H., Kitakata, A., Nakagawa, A., Minami, H., Okuda, S., Katoh, T., Katayama, T. & Kurihara, S. 2017. Use of Gifu Anaerobic Medium for culturing 32 dominant species of human gut microbes and its evaluation based on short-chain fatty acids fermentation profiles. Biosci. Biotechnol. Biochem. 81:2009-2017.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成に よって開設された腸内細菌共生機構学寄付講座において 行われたものである.本助成を賜った発酵研究所に対し てここに厚く御礼申し上げます.

文 献

Arora, T., Sharma, R., and Frost, G. 2011. Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? Appetite 56: 511-515.

- Berni Canani, R., Di Costanzo, M., and Leone, L. 2012. The epigenetic effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice. Clin. Epigenetics 4: 4.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., and Madden, T.L. 2009. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics **10**: 421.
- Charrier, C., Duncan, G.J., Reid, M.D., Rucklidge, G.J., Henderson, D., Young, P., Russell, V.J., Aminov, R.I., Flint, H.J., and Louis,

P. 2006. A novel class of CoA-transferase involved in shortchain fatty acid metabolism in butyrate-producing human colonic bacteria. Microbiology **152**: 179-185.

- Chittori, S., Savithri, H.S., and Murthy, M.R. 2012. Structural and mechanistic investigations on *Salmonella typhimurium* acetate kinase (AckA): identification of a putative ligand binding pocket at the dimeric interface. BMC Struct. Biol. **12**: 24.
- Csordas, A. 1996. Butyrate, aspirin and colorectal cancer. Eur. J. Cancer Prev. 5: 221-231.
- Diez-Gonzalez, F., Russell, J.B., and Hunter, J.B. 1996. The acetate kinase of *Clostridum acetobutylicum* strain P262. Arch. Microbiol. 166: 418-420.
- Donia, M.S., and Fischbach, M.A. 2015. HUMAN MICROBIOTA. Small molecules from the human microbiota. Science **349**: 1254766.
- Duncan, S.H., Barcenilla, A., Stewart, C.S., Pryde, S.E., and Flint, H.J. 2002. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5186-5190.
- El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., and Henrissat, B. 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. Nat. Rev. Microbiol. **11**: 497-504.
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., and White, B.A. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. Nat. Rev. Microbiol. 6: 121-131.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Suzuki, T., Taylor, T.D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., and Ohno, H. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. Nature 469: 543-547.
- Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T.D., Ohno, H., and Hattori, M. 2012. Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. Gut Microbes 3: 449-454.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N.N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K., and Ohno, H. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. Nature **504**: 446-450.
- Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L.A., Vazquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S.J., Yassour, M., Morgan, X.C., Kostic, A.D., Luo, C., Gonzalez, A., McDonald, D., Haberman, Y., Walters, T., Baker, S., Rosh, J., Stephens, M., Heyman, M., Markowitz, J., Baldassano, R., Griffiths, A., Sylvester, F., Mack, D., Kim, S., Crandall, W., Hyams, J., Huttenhower, C., Knight, R., and Xavier, R.J. 2014. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. Cell Host Microbe 15: 382-392.
- Haller, T., Buckel, T., Retey, J., and Gerlt, J.A. 2000. Discovering new enzymes and metabolic pathways: conversion of succinate

to propionate by Escherichia coli. Biochemistry 39: 4622-4629.

- Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J., and Brummer, R.J. 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. Aliment. Pharmacol. Ther. 27: 104-119.
- Hesslinger, C., Fairhurst, S.A., and Sawers, G. 1998. Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. Mol. Microbiol. **27**: 477-492.
- Honda, K., and Littman, D.R. 2012. The microbiome in infectious disease and inflammation. Annu. Rev. Immunol. 30: 759-795.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T., and Gordon, J.I. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. Annu. Rev. Nutr. 22: 283-307.
- Hosseini, E., Grootaert, C., Verstraete, W., and Van de Wiele, T. 2011. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. Nutr. Rev. **69**: 245-258.
- Louis, P., Duncan, S.H., McCrae, S.I., Millar, J., Jackson, M.S., and Flint, H.J. 2004. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. J. Bacteriol. 186: 2099-2106.
- Louis, P., Hold, G.L., and Flint, H.J. 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. Nat. Rev. Microbiol. 12: 661-672.
- Matsumoto, M., Kibe, R., Ooga, T., Aiba, Y., Sawaki, E., Koga, Y., and Benno, Y. 2013. Cerebral low-molecular metabolites influenced by intestinal microbiota: a pilot study. Front. Syst. Neurosci. **7**: 9.
- Murphy, E.F., Cotter, P.D., Healy, S., Marques, T.M., O'Sullivan, O., Fouhy, F., Clarke, S.F., O'Toole, P.W., Quigley, E.M., Stanton, C., Ross, P.R., O'Doherty, R.M., and Shanahan, F. 2010. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. Gut 59: 1635-1642.
- Murugesan, S., Ulloa-Martinez, M., Martinez-Rojano, H., Galvan-Rodriguez, F.M., Miranda-Brito, C., Romano, M.C., Pina-Escobedo, A., Pizano-Zarate, M.L., Hoyo-Vadillo, C., and Garcia-Mena, J. 2015. Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 34: 1337-1346.
- Perry, R.J., Peng, L., Barry, N.A., Cline, G.W., Zhang, D., Cardone, R.L., Petersen, K.F., Kibbey, R.G., Goodman, A.L., and Shulman, G.I. 2016. Acetate mediates a microbiome-brain-beta-cell axis to promote metabolic syndrome. Nature 534: 213-217.
- Peterson, D.A., Frank, D.N., Pace, N.R., and Gordon, J.I. 2008. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Cell Host Microbe **3**: 417-427.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J.,

Gifu 嫌気性培地を用いたヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種の培養および短鎖脂肪酸発酵特性に基づくその評価

Meta, H.I.T.C., Bork, P., Ehrlich, S.D., and Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature **464**: 59-65.

- Reichardt, N., Duncan, S.H., Young, P., Belenguer, A., McWilliam Leitch, C., Scott, K.P., Flint, H.J., and Louis, P. 2014. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. ISME J 8: 1323-1335.
- Rios-Covian, D., Sanchez, B., Salazar, N., Martinez, N., Redruello, B., Gueimonde, M., and de Los Reyes-Gavilan, C.G. 2015. Different metabolic features of *Bacteroides fragilis* growing in the presence of glucose and exopolysaccharides of bifidobacteria. Front. Microbiol. 6: 825.
- Shepherd, M.L., Ponder, M.A., Burk, A.O., Milton, S.C., and Swecker, W.S., Jr. 2014. Fibre digestibility, abundance of faecal bacteria and plasma acetate concentrations in overweight adult mares. J Nutr Sci 3: e10.
- Sommer, F., and Backhed, F. 2013. The gut microbiota-masters of host development and physiology. Nat. Rev. Microbiol. 11: 227-238.
- Spor, A., Koren, O., and Ley, R. 2011. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. Nat. Rev. Microbiol. **9**: 279-290.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A.,

Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., and Gordon, J.I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature **457**: 480-484.

- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444: 1027-1031.
- Vinolo, M.A., Rodrigues, H.G., Nachbar, R.T., and Curi, R. 2011. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. Nutrients **3**: 858-876.
- Woyke, T., Teeling, H., Ivanova, N.N., Huntemann, M., Richter, M., Gloeckner, F.O., Boffelli, D., Anderson, I.J., Barry, K.W., Shapiro, H.J., Szeto, E., Kyrpides, N.C., Mussmann, M., Amann, R., Bergin, C., Ruehland, C., Rubin, E.M., and Dubilier, N. 2006. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. Nature 443: 950-955.
- Wu, M., McNulty, N.P., Rodionov, D.A., Khoroshkin, M.S., Griffin, N.W., Cheng, J., Latreille, P., Kerstetter, R.A., Terrapon, N., Henrissat, B., Osterman, A.L., and Gordon, J.I. 2015. Genetic determinants of *in vivo* fitness and diet responsiveness in multiple human gut *Bacteroides*. Science **350**: aac5992.
- Yamamoto-Osaki, T., Kamiya, S., Sawamura, S., Kai, M., and Ozawa, A. 1994. Growth inhibition of *Clostridium difficile* by intestinal flora of infant faeces in continuous flow culture. J. Med. Microbiol. **40**: 179-187.

ヒト腸内常在菌叢最優勢種におけるポリアミン輸送および生合成の 包括的分析:新規ポリアミン代謝および輸送遺伝子の存在の可能性 杉山 友太、阪中 幹祥、栗原 新

石川県立大学生物資源環境学部寄付講座腸内細菌共生機構学 〒921-8836 石川県野々市市末松1-308

Comprehensive analysis of polyamine transport and biosynthesis in the dominant human gut bacteria: Potential presence of novel polyamine metabolism and transport genes.

Yuta Sugiyama, Mikiyasu Sakanaka, Shin Kurihara

Host-Microbe Interaction Research Laboratory Faculty of Bioresources and Environmental Sciences Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

Recent studies have reported that polyamines in the colonic lumen might affect animal health and these polyamines are thought to be produced by gut bacteria. In the present study, we measured the concentrations of three polyamines (putrescine, spermidine, and spermine) in cells and culture supernatants of 32 dominant human gut bacterial species in their growing and stationary phases. Combining polyamine concentration analysis in culture supernatant and cells with available genomic information showed that novel polyamine biosynthetic proteins and transporters were present in dominant human gut bacteria. Based on these findings, we suggested strategies for optimizing polyamine concentrations in the human colonic lumen via regulation of genes responsible for polyamine biosynthesis and transport in the dominant human gut bacteria.

Key words: gut bacteria, polyamines, polyamine transport, polyamine biosynthesis, symbiosis

緒 言

ポリアミン(プトレッシン、スペルミジン、スペルミ ン)は、2個以上のアミノ基を有する脂肪族アミンであ る.ポリアミンは真核生物(Pegg, 2009)から原核生物細 胞まで広範な生物に分布している(Tabor & Tabor,

E-mail:

- 杉山友太 (sugiyama.yuta.6s@kyoto-u.ac.jp) (現所属:京都大 学大学院農学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白 川追分町),
- 阪中幹祥(miksak@dtu.dk)(現所属: National Food Institute, Technical University of Denmark. Kemitorvet 2800 Kgs. Lyngby, Denmark).
- 栗原 新(skurihara@waka.kindai.ac.jp)(現所属:近畿大学生 物理工学部 〒 649-6433 和歌山県紀の川市西三谷 930) 共同研究者
- 奈良未沙希 (石川県立大学生物資源環境学部),
- 後藤愛那(石川県立大学生物資源環境学部),
- 北方 彩 (石川県立大学生物資源環境学部),
- 奥田修二郎 (新潟大学大学院医歯学総合研究科)

1985). 哺乳動物の結腸内腔には、ポリアミンが最大 mM オーダーの濃度で存在し (Matsumoto & Benno, 2007), これまでの研究でこれらのポリアミンが腸内細 菌に由来することが報告されている (Matsumoto et al., 2012; Noack et al., 2000). 結腸内腔内のポリアミンは結 腸粘膜を介して血流に移動し(Kibe et al., 2014),身体に 様々な影響を与える. 例えば、ガン細胞では細胞増殖を 促進するポリアミンが高濃度で見いだされ、腸内細菌由 来のポリアミンががん細胞に供給される可能性が考えら れる. そこで, 抗生物質の投与により腸内細菌由来のポ リアミンの腸管内濃度を低下させ、癌治療を行うための 研究が行われている (Johnson et al., 2015). しかしなが ら, 腸管内腔のポリアミンは, 寿命の延長 (Kibe et al., 2014; Matsumoto et al., 2011), 損傷した粘膜の回復 (Lux et al., 1980), 認知機能の増強(Kibe et al., 2014)等の, 哺乳類の健康にさまざまな有益な効果をもたらすことも 報告されている. 腸管内腔のポリアミン濃度は. 腸管内 腔に生息する様々な腸内細菌によるポリアミンの合成と

輸送の結果,決定されている.細菌の既知のポリアミン の生合成・輸送経路をFig.1に要約した(Kurihara & Suzuki, 2015; Michael, 2015; Michael, 2016; Murray-Stewart *et al.*, 2016; Sugiyama *et al.*, 2016). 最近, Kibe *et al.* (2014)は、マウスにおいて、結腸内腔のプトレッ シン濃度が増加したにもかかわらず、既知のプトレッシ ン生合成遺伝子(*speB, adi*, および *ncpah*; Fig.1)の 存在量がマウス腸内細菌叢で変化しないことを報告し た.この結果は,腸内細菌が前述のポリアミン生合成経 路(Fig.1)に加えて,プトレッシン生合成を担う新規 遺伝子あるいは新規遺伝子群(複数の酵素でプトレッシ ンが合成される場合)を有していることを示唆している.



Figure 1. Polyamine biosynthetic and transport pathways in bacteria.

Polyamine biosynthetic and transport pathways previously described in bacteria are integrated and illustrated. Gray squares indicate transporters (importer, antiporter, and exporter) that were previously reported in *Escherichia coli* or *Enterococcus* faecalis. Black squares with white letters show abbreviated names of enzymes experimentally identified in E. coli, En. faecalis, B. thetaiotaomicron, Thermus thermophilus, Vibrio cholerae, or Pseudomonas aeruginosa. The abbreviations used are as follows: AAT, agmatine aminopropyltransferase (Ohnuma et al., 2005); ADC, arginine decarboxylase (Moore & Boyle, 1990; Stim & Bennett, 1993); ADI, agmatine deiminase (Llacer et al., 2007); AdoMetDC, S-adenosylmethionine decarboxylase (Tabor & Tabor, 1987); AGM, agmatine; AguD, putrescine-agmatine antiporter (Suarez et al., 2013); APAGM, aminopropylagmatine; APAUH, aminopropylagmatine ureohydrolase (Ohnuma et al., 2005); ARG, arginine; ASA, aspartate-β-semialdehyde; AUH, agmatine ureohydrolase (Satishchandran & Boyle, 1986); CASDC, carboxyspermidine decarboxylase (Hanfrey et al., 2011; Lee et al., 2009; Sakanaka et al., 2016); CASDH, carboxyspermidine dehydrogenase (Hanfrey et al., 2011; Lee et al., 2009); CSPD, carboxyspermidine; dcSAM, decarboxylated S-adenosylmethionine; MdtJI, spermidine exporter (Higashi et al., 2008); MTA, 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine; NCP, N-carbamoylputrescine; NCPAH, N-carbamoylputrescine amidohydrolase (Nakada & Itoh, 2003); ODC, ornithine decarboxylase (Kashiwagi et al., 1991; Morris & Pardee, 1965); ORN, ornithine; PCT, putrescine carbamoyltransferase (Llacer et al., 2007); PlaP, low-affinity putrescine importer (Kurihara et al., 2011); PotABCD, ATP-binding cassette type spermidine preferential importer (Furuchi et al., 1991); PotE, putrescine-ornithine antiporter (Kashiwagi et al., 1992; Kashiwagi et al., 1997); PotFGHI, ATP-binding cassette type putrescine specific importer (Pistocchi et al., 1993); PuuP, high-affinity putrescine importer (Kurihara et al., 2009); SAM, S-adenosylmethionine; SapBCDF, putrescine exporter (Sugiyama et al., 2016); SPD, spermidine; SPDSyn, spermidine synthase (Tabor et al., 1986).

したがって、ポリアミン生合成および輸送にかかわる新 しい遺伝子の同定ができれば、その遺伝子の発現制御を 通じて、ヒト結腸内腔におけるポリアミン濃度を最適化 できると考えられる。

2010年に、ヒト腸内の主要な微生物属/種を順位付け したヒト腸内常在菌叢最優勢種が報告された (Qin et al., 2010). 我々は Gifu anaerobe medium (GAM) を用いれ ば、これらヒト腸内常在菌叢最優勢56種のうち32種が 培養可能であり、これら32種の代謝産物組成を培地のバ イアスを除去して比較可能であることを報告した (Gotoh et al., 2017). ヒト腸内常在菌叢最優勢種に含まれる Alistibes (Hamana et al., 2008), Bacteroides (Hamana et al., 2008; Hosoya & Hamana, 2004) および Parabacteroides (Hamana et al., 2008) 属細菌によって生産された定常 期におけるポリアミン濃度はこれまでに報告されてい る。しかしながら、いくつかの細菌では、細胞内および 培養上清中のポリアミン濃度はそれらの生育段階によっ て異なることが報告されている (Hanfrey et al., 2011; Sakanaka et al., 2016; Sugiyama et al., 2016). このことは、 ポリアミンが細胞増殖にとって重要であるためであると 考えられる。したがって、細菌によるポリアミンの生合 成および輸送についてのより良い洞察を行うためには, 生育段階別の細胞内および培養上清中のポリアミン濃度 の測定が必要である. さらに、ヒト腸管腔におけるポリ アミンホメオスタシスを包括的に理解するためには、こ れまでに報告のある Alistipes. Bacteroides および Parabacteroides 属細菌以外のヒト腸内常在菌叢最優勢種 のポリアミン生合成・輸送についても詳細に解析される べきである (Table 1).

本研究では、GAM で培養可能なヒト腸内常在菌叢最 優勢32種(Table 1)について、GAM で培養した場合 の増殖期と定常期における細胞内および培養上清中のポ リアミン濃度を測定した.さらに、in silico 解析を用いて、 これらのヒト腸内常在菌叢最優勢32種が新規ポリアミ ン生合成および輸送タンパク質を有する可能性について 議論する.

実験方法

実験材料

GAM ブイヨン, プトレッシン二塩酸塩, スペルミジ ン三塩酸塩, およびスペルミン四塩酸塩は, それぞれ 日水製薬, 和光純薬, ナカライテスクおよび MP Biomedicals から購入した.

菌株およびその培養条件

腸内細菌はATCC, JCM および DSMZ から入手した

(Table 1). それぞれの腸内細菌については既報(Gotoh *et al.*, 2017)にしたがって培養を行った.

細胞内および培養上清のポリアミン解析

サンプル中のポリアミン濃度は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて定量した.分析条件は既報 (Sakanaka *et al.*, 2016)に従った.培養上清および細胞 を増殖期および定常期でそれぞれサンプリングした (Sugiyama *et al.*, 2017).培養上清および細胞内のHPLC を用いたポリアミン濃度の測定に必要なサンプルの調製

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Dominance rank ^a	Strain Name	Strain number
1	Bacteroides uniformis	JCM 5828 ^T
6	Bacteroides caccae	JCM 9498 ^T
8	Bacteroides thetaiotaomicron	$JCM 5827^{T}$
17	Bacteroides vulgatus	JCM 5826 ^T
23	Bacteroides ovatus	JCM 5824 ^T
27	Bacteroides xylanisolvens	JCM 15633 ^T
32	Bacteroides dorei	JCM 13471 ^T
39	Bacteroides stercoris	JCM 9496 ^T
44	Bacteroides finegoldii	JCM 13345 ^T
51	Bacteroides intestinalis	JCM 13265 ^T
52	Bacteroides fragilis	JCM 11019 ^T
3	Parabacteroides merdae	JCM 9497 ^T
21	Parabacteroides distasonis	JCM 5825 ^T
45	Parabacteroides johnsonii	JCM 13406 ^T
4	Dorea longicatena	DSM 13814 ^T
16	Dorea formicigenerans	ATCC 27755 ^T
10	Ruminococcus torques	ATCC 27756 ^T
33	Ruminococcus obeum	DSM 25238 ^T
50	Ruminococcus gnavus	ATCC 29149 ^T
56	Blautia hansenii	JCM 14655 ^T
18	Roseburia intestinalis	DSM 14610 ^T
28	Coprococcus comes	ATCC 27758^{T}
47	Clostridium nexile	ATCC 27757 ^T
53	Clostridium asparagiforme	DSM 15981 ^T
55	Clostridium scindens	JCM 6567 ^T
14	Ruminococcus lactaris	ATCC 29176 ^T
20	Eubacterium siraeum	ATCC 29066 ^T
49	Anaerotruncus colihominis	JCM 15631
31	Eubacterium ventriosum	ATCC 27560 ^T
35	Pseudoflavonifractor capillosus	ATCC 29799 ^T
54	Enterococcus faecalis	ATCC 700802
15	Collinsella aerofaciens	JCM 7790

^{*a*}The dominance rank indicates the order of occupancy in the human gut (Qin *et al.*, 2010)

法は既報に従った (Sakanaka *et al.*, 2016). 細菌細胞を 遠心した際に生じるペレット内に残存した GAM 中に含 まれるポリアミンが細胞内ポリアミン濃度に与える影響 を最小化する目的で,培養上清を細胞ペレットから完全 に除去したが,その際に一部の細胞ペレットが失われた. このため,細胞内ポリアミンレベルを細胞タンパク質の 量に対して標準化 (nmol/mg タンパク質として濃度を 示した)し,菌種間で比較した.

BLAST 解析

プロテインBLAST (BlastP) 解析 (Camacho *et al.*, 2009)を、全ての腸内細菌種のゲノムに対して実施した. 実験によって機能が実証されたタンパク質を、BlastP解 析のためのクエリータンパク質として使用した (Sugiyama *et al.*, 2017). BlastP解析結果より100, 300, および 500 bit を超えるスコアを持つタンパク質を抽出 し、色分けした (Fig.5).

統計

値は平均値 ± 標準偏差 (S.D.) として示した. SPSS[®] ソフトウェアバージョン 21 (IBM) を用いて有意差検 定を行った.

結 果

ヒト腸内常在菌叢最優勢種におけるプトレッシン生合成 と輸送

ヒト腸内常在菌叢最優勢種の細胞中のプトレッシン濃 度を細胞タンパク質レベルに対して標準化し, nmol/ mgタンパクとして示した.細胞内プトレッシン濃度 (nmol/mgタンパク)の値(平均-S.D.)がゼロより大 きい場合,細菌は細胞内にプトレッシンを有すると判断 した.この基準に基づいて、32の試験したヒト腸内常 在菌叢最優勢種のうち5種(16%)(Bacteroides ovatus, Bacteroides xylanisolvens, Bacteroides finegoldii, Clostridium asparagiforme および Ruminococcus lactaris)では、増殖 期または定常期、あるいは、増殖期・定常期双方で、細 胞内にプトレッシンを有していた.ただし、B. xylanisolvens の細胞内プトレッシン濃度は非常に低かった(0.56 ± 0.39 nmol/mg タンパク質)(Fig.2A).

培養上清中のプトレッシン濃度の変化は、もともと GAM に含まれていたプトレッシン濃度(73.5±3.7µM, Fig.2B の灰色の帯として示した)とサンプル中のプト レッシン濃度とを比較することによって計算した. これ までにプトレッシンが細胞外で分解されることを証明す る報告はないため、培養上清中のプトレッシンレベルの 減少は、培養した細菌によるプトレッシンの取り込みに

起因すると考えられた. 試験を行った32種のヒト腸内 常在菌最優勢種のうち、22%に相当する7種(Bacteroides dorei, B. finegoldii, P. johnsonii, Dorea formicigenerans, Clostridium asparagiforme, Ruminococcus lactaris および Eubacterium ventriosum)において、増殖期または定常期、 あるいは, 増殖期・定常期双方で, 培養上清中でのプトレッ シン濃度の減少が観察された(Fig.2B).対照的に、試 験を行った32種のヒト腸内常在菌最優勢種のうち、13% に相当する4種(Bacteroides intestinalis, Ruminococcus obeum, Clostridium scindens および Enterococcus faecalis) において、増殖期あるいは定常期の培養上清中のプトレッ シン濃度は培養開始時と比較して増加した(Fig.2B). また、試験を行った32種のヒト腸内常在菌最優勢種の うち, 16%に相当する5種(*B. dorei*, *Bacteroides stercoris*, Ruminococcus torques, Anaerotruncus colihominis および E. faecalis) において、培養上清中のプトレッシン濃度 が増殖期から定常期へかけて増加した(Fig.2B).

ヒト腸内常在菌叢最優勢種におけるスペルミジン生合成 と輸送

細胞内スペルミジンの存在についてはプトレッシンに ついて用いたものと同じ基準で判定を行った. 試験した 32種のヒト腸内常在菌叢最優勢種のうち,スペルミジ ンが検出されなかった D. formicigenerans と Collinsella aerofaciens を除き,増殖期あるいは定常期において細胞 内にスペルミジンが検出された (Fig.3A). この中で, C. nexile の細胞内スペルミジン濃度は非常に低かった (7.3 ± 5.2 nmol/mg タンパク質) (Fig.3A).

培養上清中のスペルミジン濃度の変化は、もともと GAM に含まれていたスペルミジン濃度(24.6 ± 1.0μ M, Fig.3Bの灰色の帯として示した)とサンプル中のスペ ルミジン濃度とを比較することによって計算した.こ れまでにスペルミジンが細胞外で分解されることを証 明する報告はないため、培養上清中のスペルミジンレ ベルの減少は、培養した細菌によるスペルミジンの取り 込みに起因すると考えられた. 試験を行った32種のヒ ト腸内常在菌最優勢種のうち,69%に相当する22種 (Bacteroides caccae, Bacteroides thetaiotaomicron, Bacteroides vulgatus, Bacteroides ovatus, B. xylanisolvens, B. dorei, B, stercoris, B. finegoldii, Bacteroides fragilis, P. johnsonii, Dorea longicatena, Dorea formicigenerans, Ruminococcus gnvaus, Roseburia intestinalis, Coprococcus comes, Clostridium nexile, C. asparagiforme, Clostridium scindens, R. lactaris, A. colihomihis, Pseudoflavonifractor capillosus および E. faecalis) において, 増殖期または定 常期で培養上清中でのスペルミジン濃度の減少が観察さ れた(Fig.3B). 試験を行った32種のヒト腸内常在菌



Figure 2. Putrescine concentration in culture supernatants and cells of dominant human gut bacteria.

(A) Intracellular putrescine concentrations in dominant human gut bacteria in growing and stationary phases. The amount of putrescine in the cell was quantified by HPLC and normalized to the cellular protein concentration. White bars show putrescine concentrations in the growing phase, black bars show those in the stationary phase. Data are represented as mean \pm S.D. (n=3). (B) Putrescine concentration in culture supernatants of gut bacteria in the growing and stationary phases. Gray bands indicate the maximum and minimum putrescine concentration values in GAM (n=3). White bars show the putrescine concentrations in growing phase, and black bars show those in the stationary phase. Data are mean \pm S.D. (n=3). **p*<0.01 (Dunnett's test in comparison with GAM). †*p*<0.01 (two-tailed unpaired *t*-test). The number shown before the species name indicates the order of gut bacterial occupancy (Qin *et al.*, 2010).



Figure 3. Spermidine concentration in culture supernatants and cells of dominant human gut bacteria.

(A) Intracellular spermidine concentration in the gut bacteria in the growing and stationary phases. The amount of spermidine in the cell was quantified by HPLC, and normalized to the cellular protein concentration. White bars indicate spermidine concentrations in the growing phase, black bars indicate those in the stationary phase. Data are represented as mean ± S.D. (n=3).
(B) Spermidine concentration in the culture supernatant of the gut bacteria in the growing and stationary phases. The gray band indicates the maximum and minimum spermidine concentrations in GAM (n=3). White bars show the spermidine concentrations in the growing phase, black bars show those in the stationary phase. Data are represented mean ± S.D. (n=3).
**p*<0.01 (Dunnett's test in comparison with GAM). [†]*p*<0.01 (two-tailed unpaired *t*-test). The number shown before the species name indicates the order of gut bacterial occupancy (Qin *et al.*, 2010).

最優勢種のうち、13%に相当する4種(*B. dorei, D. formicigenerans, R. torques* および *Blautia hansenii*)において、培養上清中のスペルミジン濃度が増殖期から定常期へかけて増加した(Fig.3B).また、試験を行った32種のヒト腸内常在菌最優勢種のうち、31%に相当する10種(*Bacteroides uniformis, B. intestinalis, P. merdae, P. distasonis, R. torques, R. obeum, Bl. hansenii, Eubacterium siraeum, Eubacterium ventriosum および Co. aerofaciens)では、GAM に含まれるスペルミジン濃度間で有意差は認められなかった(Fig.3B).*

ヒト腸内常在菌叢最優勢種におけるスペルミン生合成と 輸送

細胞内スペルミンの存在についてはプトレッシンに ついて用いたものと同じ基準で判定を行った. 試験し た 32種のヒト腸内常在菌叢最優勢種のうち 41%に相当 する 13 菌種 (*B. vulagus*, *B. xylanisolvens*, *B. intestinalis*, *B. fragilis*, *P. merdae*, *D. longicatena*, *D. formicigenerans*, *R. torques*, *R. obeum*, *R. gnavus*, *Eu. siraeum*, *Eu. ventriosum* および *Ps. capillosus*)で, 増殖期あるいは定常期におい てスペルミンが検出された (Fig. 4A). しかし, *B. vulgatus*, *B. xylanisolvens*, *B. fragilis*, *P. merdae*の細胞内ス ペルミン濃度は非常に低かった (\leq 3.2nmol/mg タンパ ク質) (Fig. 4A).

培養上清中のスペルミン濃度の変化は、もともと GAM に含まれていたスペルミン濃度(8.4±0.4µM, Fig.4Bの灰色の帯として示した)とサンプル中のスペ ルミン濃度とを比較することによって計算した.プト レッシン、スペルミジンと同様、これまでにスペルミン が細胞外で分解されることを証明する報告がないため、 培養上清中のスペルミンレベルの減少は、培養した細菌 によるスペルミンの取り込みに起因すると考えられた. 試験を行った32種のヒト腸内常在菌最優勢種のうち、 P. merdaeを除き、増殖期または定常期で培養上清中で のスペルミン濃度の減少が観察された(Fig.4B).また、 試験を行った32種のヒト腸内常在菌最優勢種のうち、 9%に相当する3種(B. stercoris, D. longicatena および R. torques)において、培養上清中のスペルミン濃度が 増殖期から定常期へかけて増加した(Fig.4B).

ヒト腸内常在菌叢最優勢種における既知のポリアミン生 合成および輸送タンパクの存在

BlastP解析を用いて、ヒト腸内常在菌叢最優勢種にお ける既知のポリアミン生合成または輸送タンパクの有無 を判定した(Fig.5). ほとんどすべてのヒト腸内常在 菌叢最優勢種において、PotABCD(スペルミジン取り

込みタンパク質)および PotFGHI (プトレッシン取り 込みタンパク質)が保存されており、CASDC(カルボ キシスペルミジンデカルボキシラーゼ), CASDH (カル ボキシスペルミジンデヒドロゲナーゼ)は、多くのヒト 腸内常時菌叢最優勢種に保存されていた.また,SpeA(ア ルギニンデカルボキシラーゼ), NCPAH (N-カルバモ イルプトレッシンアミドヒドロラーゼ)は主に Bacteroides 属および Parabacteroides 属細菌によく保存 されていた. 一方で、SapBCDF(プトレッシンエクスポー ター), SpeB (アグマチンウレオハイドロラーゼ). AAT (アグマチンアミノプロピルトランスフェラーゼ). APAUH(アミノプロピルアグマチンウレオハイドロラー ゼ), SpeE (スペルミジンシンターゼ), AguB (N-カル バモイルプトレッシンアミドヒドロラーゼ) は Bacteroides 属および Parabacteroides 属細菌以外の腸内細菌によく 保存されていた.

大腸菌において機能報告のある AdiA (アルギニンデ カルボキシラーゼ), SpeC および SpeF (いずれもオル ニチンデカルボキシラーゼ), PuuP (プトレッシン取り 込みタンパク質)および MdtJI (スペルミジンエクスポー ター) についてはヒト腸内常在菌最優勢種のゲノム中に そのホモログは殆どあるいは全く見いだされなかった.

考 察

本研究で培養を行ったヒト腸内常在菌叢最優勢32種の細胞内および培養上清のポリアミン解析の結果と, BlastP解析による既知ポリアミン代謝系・輸送系を構成 するタンパクホモログの有無の判定結果を統合し、矛盾 点を抽出する手法で、未知のポリアミン代謝系・輸送系 の存在を推定した。例えば、スペルミジン取り込みが観 察された菌種において既知のスペルミジン取り込みタン パクのホモログが存在しない場合は、この菌が未知のス ペルミジン取り込みタンパクを有していると推定した。

この結果、ヒト腸内常在菌叢最優勢32種のうち、新規 ポリアミン取り込み系を持つと推定されるものが少なく とも2菌種(Eu. siraeum, Col. aerofaciens),新規ポリア ミン放出系を持つと推定されるものが少なくとも6菌種 (B. dorei, B. stercoris, D. longicatena, D. formicigenerans, R. torques および Bl. hansenii),新規ポリアミン合成系 を持つと推定されるものが少なくとも3菌種(D. longicatena, P. merdae および Eu. ventriosum)存在した (Fig.6).以上の見積もりは、一つの菌種が重複した機 能を持つ遺伝子を持たないと仮定して行われたため(例 えば、ポリアミンの取り込みが観察された菌種のゲノム にポリアミン取り込み系のホモログが一つでも存在すれ ば新規のものはないと仮定して見積もりを行った.)、重



Figure 4. Spermine concentrations in culture supernatants and cells of the dominant human gut bacteria.

(A) Intracellular spermine concentration in the gut bacteria in the growing and stationary phases. The spermine in the cell was quantified by HPLC, and normalized to the cellular protein concentration. White bars show spermine concentrations in the growing phase, black bars show those in the stationary phase. Data are represented as mean \pm S.D. (n=3).

(B) Spermine concentration in the culture supernatant of the gut bacteria in growing and stationary phases. The gray band indicates the maximum and minimum spermine concentrations in GAM (n=3). White bars show the spermine concentrations in the growing phase; black bars show those in the stationary phase. Data are represented as mean \pm S.D. (n=3). *p<0.01 (Dunnett's test in comparison with GAM). $^{\dagger}p$ <0.01 (two-tailed unpaired *t*-test). The number shown before the species name indicates the order of gut bacterial occupancy (Qin *et al.*, 2010).86



Figure 5. Occurrence of homologous proteins responsible for synthesis and transport of polyamines in the genomes of dominant human gut bacteria.

The BlastP analysis was performed against the genomes of the dominant human gut bacteria using query proteins listed in Supplementary Table S1. Black, dark gray, light gray, and white boxes indicate the result of homologs with scores>500 bits, between 300 and 500 bits, between 100 and 300 bits, and<100 bits, respectively. The number shown before the species name indicates the order of gut bacterial occupancy in a "human gut microbial gene catalog" (Qin *et al.*, 2010).

杉山 友太, 阪中 幹祥, 栗原 新



Figure 6. Novel polyamine biosynthetic proteins and transporters expected to exist in the tested dominant human gut bacteria. The presence of novel polyamine biosynthetic proteins and transporters was predicted from the changes in polyamine biosynthetic proteins and transporters or absence of homologs of known polyamine biosynthetic proteins and transporters. Presence or absence of novel polyamine biosynthetic proteins and transporters is indicated by the color of boxes; gray boxes indicate presence and white boxes indicate absence. The number shown before the species name indicates the order of gut microbial occupancy in a "human gut microbial gene catalog" (Qin *et al.*, 2010).

複した機能を持つ遺伝子の存在の可能性を考慮した場合 は、さらに多くの機能未知遺伝子が存在することが考え られる.これらの機能未知遺伝子を解明し、その機能を 制御することができれば、ヒト腸管内腔のポリアミン濃 度を最適化し、ヒト健康寿命を延伸することが可能とな ると考えられる.

要 約

近年,結腸内腔のポリアミンが動物の健康に影響を与 える可能性が報告されており,これらのポリアミンは腸 内細菌によって産生されることが知られている.本研究 では,増殖期および定常期におけるヒト腸内常在菌叢最 優勢32種の細胞内および培養上清中のポリアミン(プ トレッシン,スペルミジン,およびスペルミン)の濃度 を測定した.これらのポリアミン濃度の定量結果を,ゲ ノム情報から推測される生合成酵素・トランスポーター の有無と組み合わせることにより,多くの未知のポリア ミン生合成酵素およびトランスポーターがヒト腸内常在 菌叢最優勢種に存在することが示された.これらの機能 未知遺伝子を解明し,その機能を制御することができれ ば,ヒト腸管内腔のポリアミン濃度を最適化し,ヒト健 康寿命を延伸することが可能となると考えられる.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 奈良 未沙希,片山 高嶺,栗原 新. 2015. ヒト腸内細菌優占 種の菌体内および培養上清におけるポリアミン解析.日本 ポリアミン学会第6回年会.1月19日.東京.
- 2) 栗原 新,松本 光晴,鈴木 秀之.2015.腸内細菌のポリアミン代謝,輸送系同定の重要性.日本農芸化学会2015年度大会「ポリアミン研究のさらなる発展と新たな展開をめざした農芸化学と医学薬学との融合」シンポジウム.3月29日.岡山.
- 3) 栗原 新, 奈良 未沙希, 白石 友香, 片山 高嶺. 2015. 腸内 細菌の新規ポリアミン合成系, 輸送系同定の重要性. 2015 年度 日本乳酸菌学会泊まり込みセミナー. 5月14日. 南あ わじ.
- Nara, M, Katayama, T., Kurihara, S. 2015. Analysis of polyamine in the culture supernatant and cells of major human intestinal bacteria. ポリアミンに関するゴードン研究会議. 6月15日. 米国, ニューハンプシャー州.
- 5) Kurihara, S., Nara, M., Shiraishi, Y., Katayama, T. 2015. Construction of screening system for novel polyamine biosynthetic pathway of major intestinal bacteria. 2015. ポリ アミンに関するゴードン研究会議. 6月15日. 米国, ニュー ハンプシャー州.
- 6) 栗原 新,奈良 未沙希,白石 友香,杉山 友太,片山 高嶺. 2015. ヒト腸内細菌最優勢種のポリアミン輸送能,合成能の網羅的解析.2015年度日本農芸化学会中部,関西支部合同大会(中部支部第174回例会,関西支部第491回講演会).9月19日.射水.
- 7)奈良未沙希,杉山友太,阪中幹祥,奥田修二郎,片山 高嶺,栗原新.2017.ヒト腸内細菌最優勢種の菌体内および培養上清における生育段階別のポリアミン解析と新規 ポリアミン合成,輸送系存在についてのin silico予測.日本 農芸化学会大会2017年度大会.3月19日.京都.
- 8) 奈良 未沙希,杉山 友太,阪中 幹祥,奥田 修二郎,片山 高嶺,栗原新.2017.ヒト腸内細菌最優勢種の菌体内およ び培養上清における生育段階別のポリアミン解析.日本ポ リアミン学会第8回年会.1月20日.習志野.
- 原著論文
 - Sugiyama, Y., Nara, M., Sakanaka, M., Gotoh, A., Kitakata, A., Okuda, S. & Kurihara, S. 2017. Comprehensive analysis of polyamine transport and biosynthesis in the dominant human gut bacteria: potential presence of novel polyamine

metabolism and transport genes. Int. J. Biochem. Cell Biol. 93: 52-61.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成に よって開設された腸内細菌共生機構学寄付講座において 行われたものである.本助成を賜った発酵研究所に対し てここに厚く御礼申し上げます.本寄附講座世話人であ る石川県立大学・熊谷英彦参与のご支援とご協力に感謝 の意を表します.

文 献

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. & Madden, T.L. 2009. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics **10**: 421.
- Furuchi, T., Kashiwagi, K., Kobayashi, H. & Igarashi, K. 1991. Characteristics of the gene for a spermidine and putrescine transport system that maps at 15 min on the *Escherichia coli* chromosome. J. Biol. Chem. **266**: 20928-20933.
- Gotoh, A., Nara, M., Sugiyama, Y., Sakanaka, M., Yachi, H., Kitakata, A., Nakagawa, A., Minami, H., Okuda, S., Katoh, T., Katayama, T. & Kurihara, S. 2017. Use of Gifu Anaerobic Medium for culturing 32 dominant species of human gut microbes and its evaluation based on short-chain fatty acids fermentation profiles. Biosci. Biotechnol. Biochem. 81: 2009-2017.
- Hamana, K., Itoh, T., Benno, Y. & Hayashi, H. 2008. Polyamine distribution profiles of new members of the phylum Bacteroidetes. J. Gen. Appl. Microbiol. 54: 229-236.
- Hanfrey, C.C., Pearson, B.M., Hazeldine, S., Lee, J., Gaskin, D.J., Woster, P.M., Phillips, M.A. & Michael, A.J. 2011. Alternative spermidine biosynthetic route is critical for growth of *Campylobacter jejuni* and is the dominant polyamine pathway in human gut microbiota. J. Biol. Chem. **286**: 43301-43312.
- Higashi, K., Ishigure, H., Demizu, R., Uemura, T., Nishino, K., Yamaguchi, A., Kashiwagi, K. & Igarashi, K. 2008. Identification of a spermidine excretion protein complex (MdtJI) in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **190**: 872-878.
- Hosoya, R. & Hamana, K. 2004. Distribution of two triamines, spermidine and homospermidine, and an aromatic amine, 2-phenylethylamine, within the phylum Bacteroidetes. J. Gen. Appl. Microbiol. **50**: 255-260.
- Johnson, C.H., Dejea, C.M., Edler, D., Hoang, L.T., Santidrian, A.F., Felding, B.H., Ivanisevic, J., Cho, K., Wick, E.C., Hechenbleikner, E.M., Uritboonthai, W., Goetz, L., Casero, R.A., Jr., Pardoll, D.M., White, J.R., Patti, G.J., Sears, C.L. & Siuzdak, G. 2015. Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis. Cell Metab. 21: 891-897.
- Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Suzuki, F., Kobayashi, H. & Igarashi, K. 1992. Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the *potE* gene of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 4529-4533.
- Kashiwagi, K., Shibuya, S., Tomitori, H., Kuraishi, A. & Igarashi, K. 1997. Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **272**: 6318-6323.

- Kashiwagi, K., Suzuki, T., Suzuki, F., Furuchi, T., Kobayashi, H. & Igarashi, K. 1991. Coexistence of the genes for putrescine transport protein and ornithine decarboxylase at 16 min on *Escherichia coli* chromosome. J. Biol. Chem. **266**: 20922-20927.
- Kibe, R., Kurihara, S., Sakai, Y., Suzuki, H., Ooga, T., Sawaki, E., Muramatsu, K., Nakamura, A., Yamashita, A., Kitada, Y., Kakeyama, M., Benno, Y. & Matsumoto, M. 2014. Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. Sci. Rep. 4: 4548.
- Kurihara, S. & Suzuki, H. 2015. Recent advances in bacterial polyamine transport systems. *In* Polyamines, p. 171-178, (Springer).
- Kurihara, S., Suzuki, H., Oshida, M. & Benno, Y. 2011. A novel putrescine importer required for type 1 pili-driven surface motility induced by extracellular putrescine in *Escherichia coli* K-12. J. Biol. Chem. **286**: 10185-10192.
- Kurihara, S., Tsuboi, Y., Oda, S., Kim, H.G., Kumagai, H. & Suzuki, H. 2009. The putrescine Importer PuuP of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **191**: 2776-2782.
- Lee, J., Sperandio, V., Frantz, D.E., Longgood, J., Camilli, A., Phillips, M.A. & Michael, A.J. 2009. An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholerae*. J. Biol. Chem. 284: 9899-9907.
- Llacer, J.L., Polo, L.M., Tavarez, S., Alarcon, B., Hilario, R. & Rubio, V. 2007. The gene cluster for agmatine catabolism of *Enterococcus faecalis*: study of recombinant putrescine transcarbamylase and agmatine deiminase and a snapshot of agmatine deiminase catalyzing its reaction. J. Bacteriol. 189: 1254-1265.
- Lux, G.D., Marton, L.J. & Baylin, S.B. 1980. Ornithine decarboxylase is important in intestinal mucosal maturation and recovery from injury in rats. Science 210: 195-198.
- Matsumoto, M. & Benno, Y. 2007. The relationship between microbiota and polyamine concentration in the human intestine: a pilot study. Microbiol. Immunol. 51: 25-35.
- Matsumoto, M., Kibe, R., Ooga, T., Aiba, Y., Kurihara, S., Sawaki, E., Koga, Y. & Benno, Y. 2012. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. Sci. Rep. 2: 233.
- Matsumoto, M., Kurihara, S., Kibe, R., Ashida, H. & Benno, Y. 2011. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. PLoS One 6: e23652.
- Michael, A.J. 2015. Biosynthesis of polyamines in eukaryotes, archaea, and bacteria. *In* Polyamines p. 3-14. (Springer).
- Michael, A.J. 2016. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea. J. Biol. Chem. **291**: 14896-14903.
- Moore, R.C. & Boyle, S.M. 1990. Nucleotide sequence and analysis of the *speA* gene encoding biosynthetic arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **172**: 4631-4640.
- Morris, D.R. & Pardee, A.B. 1965. A biosynthetic ornithine decarboxylase in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20: 697-702.
- Murray-Stewart, T.R., Woster, P.M. & Casero, R.A., Jr. 2016. Targeting polyamine metabolism for cancer therapy and prevention. Biochem. J. **473**: 2937-2953.
- Nakada, Y. & Itoh, Y. 2003. Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and *N*-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway. Microbiology 149: 707-714.
- Noack, J., Dongowski, G., Hartmann, L. & Blaut, M. 2000. The human

gut bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Fusobacterium varium* produce putrescine and spermidine in cecum of pectin-fed gnotobiotic rats. J. Nutr. **130**: 1225-1231.

- Ohnuma, M., Terui, Y., Tamakoshi, M., Mitome, H., Niitsu, M., Samejima, K., Kawashima, E. & Oshima, T. 2005. N1aminopropylagmatine, a new polyamine produced as a key intermediate in polyamine biosynthesis of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. J. Biol. Chem. **280**: 30073-30082.
- Pegg, A.E. 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. IUBMB Life 61: 880-894.
- Pistocchi, R., Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Nukui, E., Sadakata, Y., Kobayashi, H. & Igarashi, K. 1993. Characteristics of the operon for a putrescine transport system that maps at 19 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. J. Biol. Chem. 268: 146-152.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Meta, H.I.T.C., Bork, P., Ehrlich, S.D. & Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 464: 59-65.
- Sakanaka, M., Sugiyama, Y., Kitakata, A., Katayama, T. & Kurihara, S. 2016. Carboxyspermidine decarboxylase of the prominent intestinal microbiota species *Bacteroides thetaiotaomicron* is required for spermidine biosynthesis and contributes to normal growth. Amino Acids 48: 2443-2451.
- Satishchandran, C. & Boyle, S.M. 1986. Purification and properties of agmatine ureohydrolyase, a putrescine biosynthetic enzyme in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 165: 843-848.
- Stim, K.P. & Bennett, G.N. 1993. Nucleotide sequence of the adi gene, which encodes the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175**: 1221-1234.
- Suarez, C., Espariz, M., Blancato, V.S. & Magni, C. 2013. Expression of the agmatine deiminase pathway in *Enterococcus faecalis* is activated by the AguR regulator and repressed by CcpA and PTS(Man) systems. PLoS One 8: e76170.
- Sugiyama, Y., Nakamura, A., Matsumoto, M., Kanbe, A., Sakanaka, M., Higashi, K., Igarashi, K., Katayama, T., Suzuki, H. & Kurihara, S. 2016. A Novel Putrescine Exporter SapBCDF of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **291**: 26343-26351.
- Sugiyama, Y., Nara, M., Sakanaka, M., Gotoh, A., Kitakata, A., Okuda, S. & Kurihara, S. 2017. Comprehensive analysis of polyamine transport and biosynthesis in the dominant human gut bacteria: Potential presence of novel polyamine metabolism and transport genes. Int. J. Biochem. Cell Biol. 93: 52-61.
- Tabor, C.W. & Tabor, H. 1985. Polyamines in microorganisms. Microbiol. Rev. 49: 81-99.
- Tabor, C.W. & Tabor, H. 1987. The *speEspeD* operon of *Escherichia coli*. Formation and processing of a proenzyme form of S-adenosylmethionine decarboxylase. J. Biol. Chem. 262: 16037-16040.
- Tabor, C.W., Tabor, H. & Xie, Q.W. 1986. Spermidine synthase of *Escherichia coli*: localization of the *speE* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83: 6040-6044.

中性の生育条件下で機能する 大腸菌の新規プトレッシンエクスポーター SapBCDF の同定 _{杉山 友太、阪中 幹祥、片山 高嶺、栗原 新}

石川県立大学生物資源環境学部寄付講座腸内細菌共生機構学 〒921-8836 石川県野々市市末松1-308

Identification of SapBCDF as a novel putrescine exporter of *Escherichia coli*

Yuta Sugiyama, Mikiyasu Sakanaka, Takane Katayama, Shin Kurihara

Host-Microbe Interaction Research Laboratory Faculty of Bioresources and Environmental Sciences Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

It has been reported that polyamines present in the intestinal tract at a concentration of several hundreds of μM and have an important influence on host health. Intestinal polyamines are produced and released by gut bacteria. In *Escherichia coli*, a model of gut bacteria, PotE which is a polyamine-releasing system that responds to acid stress has been reported so far. However, even under neutral growth conditions, *E. coli* extracellularly release putrescine. In this study, we identified a novel putrescine exporter of *E. coli* that function under neutral growth conditions. The screening was performed using a gene knockout collection of *E. coli*, and *sapD* and *sapF* which are components of *sapABCDF* operon were estimated to encode putrescine excreted protein or a part of it. Deletion of *sapBCDF* significantly decreased putrescine levels in the culture supernatant, and complementation of the deletion mutant with the *sapBCDF* genes restored putrescine levels in the culture supernatant. Furthermore, the concentration of *sapBCDF* presence in *E. coli*. From these results, we concluded that SapBCDF exported putrescine from *E. coli* cells to culture supernatant.

Key words: putrescine, polyamine, Escherichia coli, gut bacteria

E-mail:

- 杉山友太(sugiyama.yuta.6s@kyoto-u.ac.jp)(現所属:京都大 学大学院農学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白 川追分町),
- 阪中幹祥(miksak@dtu.dk)(現所属:National Food Institute, Technical University of Denmark. Kemitorvet 2800 Kgs. Lyngby, Denmark),
- 片山高嶺 (takane@lif.kyoto-u.ac.jp) (現所属:京都大学大学院 生命科学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白川追 分町),
- 栗原 新 (skurihara@waka.kindai.ac.jp) (現所属:近畿大学生 物理工学部 〒 649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930)

共同研究者

- 中村篤央(協同乳業株式会社),
- 松本光晴(協同乳業株式会社),
- 神戸亜也香 (京都工芸繊維大学応用生物学系),
- 東 恭平(千葉大学大学院薬学研究科,現東京理科大学薬学部),
- 五十嵐一衛 (アミンファーマ研究所),
- 鈴木秀之(京都工芸繊維大学応用生物学系)

緒 言

ポリアミンは、構造中に2つ以上のアミノ基を有する 脂肪族アミンであり、主なものにプトレッシン、スペル ミジンおよびスペルミンが存在する.ポリアミンは真核 細胞から原核細胞まで広く分布し(Tabor & Tabor, 1985; Wortham *et al.*, 2007; Pegg, 2009; Tiburcio *et al.*, 2014),細胞内で核酸などのポリアニオンに結合し、タ ンパク質および核酸の合成を促進し、増殖因子として重 要な役割を果たしていると考えられている(Pegg, 2009; Tiburcio *et al.*, 2014). 実際,活発に増殖している細胞(対 数増殖期の細菌など)において、ポリアミンは最大数 10mM という高濃度で存在している(Igarashi & Kashiwagi, 2000).

動物の腸管内にもポリアミンは存在しており、これは 腸内細菌由来であると報告されている(Matsumoto *et* al., 2012). さらに, 腸管内のポリアミンが動物の健康 に影響を与えることが近年報告されている(Goodwin et al., 2011; Matsumoto et al., 2011; Kibe et al., 2014). 例え ば, 腸管病原性の Bacteroides fragilis による結腸腫瘍形 成への寄与(Goodwin et al., 2011)が報告されている一 方で, 腸管内腔のポリアミンが宿主に好影響を与えるこ とも報告されている.例えば,マウスモデルにおいて大 腸内腔で腸内細菌によって産生されるポリアミンを増加 させることで,老化が遅延することが報告されている (Matsumoto et al., 2011; Kibe et al., 2014).

ところで、生理的 pH ではポリアミンは正に荷電して おり親水性であることから、拡散により疎水性である細 胞膜を透過することはできない.したがって、細菌はポ リアミンの取り込みと排出を行う際にポリアミントラン スポーターを必要とする.したがって、腸管内のポリア ミン濃度は腸内細菌のポリアミントランスポーターを介 した取り込みと排出のバランスにより決定されるといえる.

モデル腸内細菌の一つである大腸菌では、これまでに 5 つのポリアミントランスポーターが同定されている. PotFGHIは、 プトレッシンを取り込む ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターであり (Pistocchi et al., 1993), PotABCD は、スペルミジンに高く、プトレッ シンに低い親和性を示す ABC トランスポーターである (Furuchi et al., 1991). PuuPは、プロトン駆動型のプ トレッシンインポーターであり、大腸菌がプトレッシン を唯一の炭素源あるいは窒素源とした条件下で生育する 際に必須のトランスポーターである (Kurihara et al., 2009). PlaPは、大腸菌が表面運動性を示す際に重要な プロトン駆動型のプトレッシンインポーターである (Kurihara et al., 2011). PotE は中性 pH の生育環境下で はプロトン駆動型のプトレッシンインポーターとして機 能するが、酸性 pH の生育環境下ではオルニチンを取り 込み、プトレッシンを排出するプトレッシン/オルニチ ンアンチポーターとして機能し、PotEは大腸菌の酸性 環境への適応に寄与していると考えられている (Kashiwagi et al., 1992; Kashiwagi et al., 1997). 一方で, 大腸菌は中性の生育環境下においても PotE 非依存的に プトレッシンを培養上清に放出することが報告されてい る (Schiller et al., 2000). これは, 大腸菌が中性の生育 環境下でプトレッシンを排出するプトレッシンエクス ポーターを有していることを示唆している.

腸管内のポリアミン濃度を制御する上で,宿主に重要 な影響を与える腸管内のポリアミン源である腸内細菌の ポリアミン代謝,特にポリアミンの排出を分子レベルで 理解することは,極めて重要であるといえる.本研究で は,腸内細菌の一種である大腸菌の新規プトレッシンエ クスポーターを同定するためKeio コレクション (Baba *et al.*, 2006)を用いたゲノムワイドスクリーニングを行い, *sapBCDF*オペロンが中性の生育条件下でのプトレッシン排出に寄与していることを遺伝子レベルで実証した.

実験方法

使用菌株および使用プラスミド

本研究で使用した菌株とプラスミドを Table 1 に示し た. ただし、Keio コレクション(Baba et al., 2006)を 用いたプトレッシンエクスポーターのスクリーニングに 使用した株は Sugiyama et al. (2016) にすでに報告した. SK623 (MG1655 $\Delta puuP$::FRT) はKeio コレクション (Baba et al., 2006)のJW1289をドナーとして用いたP1 transduction 法 (Miller, 1972) により、 *ApuuP*::FRT*kan*⁺-FRT を, MG1655 に導入した後に, プラスミド pCP20 (Datsenko & Wanner, 2000) を用いて kan⁺ 遺伝 子を除去する手法で作出した. speB, speCおよび sapBCDFの遺伝子破壊はpKD3もしくはpKD13を用い て、Datsenko & Wannerの方法(2000)に従い行った. 相補プラスミド (pACYC184-sapB⁺C⁺D⁺F⁺) は MG1655 のゲノム DNA を鋳型とした PCR により sabB の上流領 域 500 bp を含む DNA 断片を増幅し, 増幅断片を HindIII および SphI で消化した pACYC184 に挿入し作製した. シークエンス解析によりクローニングした DNA 断片に 変異がないことを確認した.

培地および培養条件

遺伝子操作時の培養, および, 種々のアッセイ時の前培養 は, Luria-Bertani (LB) 培地 (BD Difco) を用いて行った.

M9+トリプトン培地(M9最少培地の炭素源として グルコースの代わりに1%バクト-トリプトンを使用し た培地)(Kurihara *et al.*, 2005)を抗菌ペプチドアッセ イおよび菌株の培養上清のプトレッシン濃度の解析に使 用した.

puuPはコハク酸によって負に調節される(Kurihara et al., 2010). そこで,染色体上にpuuPを有する株の培 養上清中のプトレッシン濃度を解析する際は,培養上清 中に排出されたプトレッシンの取り込みを抑制する目的 で,コハク酸ナトリウムを M9+トリプトン培地に終濃 度 0.2%となるよう添加して培養した(この培地を M9 +トリプトン+コハク酸培地とした).培養上清中の安 定同位体標識プトレッシン濃度の分析のために,安定同 位体標識アルギニンを終濃度1mMとなるよう M9+ト リプトン培地に添加した.

培養上清中のプトレッシン濃度を測定する実験において、前培養は100mL容の三角フラスコへ10mLの適切 な抗生物質を含むLB培地を添加し、37℃で140rpmで

Strain and plasmid	Characteristic	Source or Reference
Bacteria strain		
BW25113	$rrnB3 \Delta lacZ4787 hsdR514 \Delta (araBAD)567 \Delta (rhaBAD)568 rph-1$	Baba et al., 2006; Grenier et al., 2014
MG1655	F ⁻ prototrophic	Laboratory stock
SK614	MG1655 Δ <i>puuP::kan</i> ⁺ FRT	This study
SK623	MG1655 Δ <i>puuP</i> ::FRT	This study
SK626	MG1655 $\Delta puuP$::FRT $\Delta sapBCDF$:: kan^+ FRT	This study
SK627	pACYC184/SK623	This study
SK628	pACYC184/SK626	This study
SK634	pSK607/ SK626	This study
YS40	MG1655 $\Delta sapBCDF$::kan ⁺ FRT	This study
YS111	pACYC184/MG1655	This study
YS112	pACYC184/YS40	This study
YS113	pSK607/YS40	This study
YS226	MG1655 $\Delta puuP$::FRT $\Delta speB$::FRT $\Delta speC$::FRT	This study
YS227	MG1655 ΔpuuP::FRT ΔspeB::FRT ΔspeC::FRT ΔsapBCDF::FRT	This study
YS233	pACYC184/YS226	This study
YS234	pACYC184/YS227	This study
YS235	pSK607/YS227	This study
Plasmid		
pACYC184	p15A replicon cat^+ tet^+	New England Biolabs
pCP20	$oriR101\ bla^+\ cat^+\ cI857\ \lambda PR$	Datsenko and Wanner, 2000
pKD3	oriRy bla ⁺ FRT-cat ⁺ -FRT	Datsenko and Wanner, 2000
pKD13	<i>oriRy bla</i> ⁺ FRT- <i>kan</i> ⁺ -FRT	Datsenko and Wanner, 2000
pACYC184-sap $B^+C^+D^+F^+$	pACYC184 containing $sapB^+C^+D^+F^+$	This study

Table 1 Strains and plasm	nids used in this study.
----------------------------------	--------------------------

This table is modified from table 1 of Sugiyama et al. (2016).

振盪培養した.本培養は300mL容の三角フラスコへ 60mLの培地を添加し,初期OD₆₀₀が0.03となるよう前 培養液を加え,37℃で140rpmで振盪培養した.

Keio コレクションを用いたプトレッシンエクスポー ターのスクリーニング時は、20mL 試験管へ5mLのM9 +トリプトン+コハク酸培地を添加し、37℃、140rpm で6時間振盪培養を行った.

抗菌ペプチドアッセイ

抗菌ペプチドLL-37に対するMG1655およびYS40 (MG1655 Δ*sapBCDF*::FRT-*Kan*'-FRT)の感受性を評価 するために, Harwig *et al.* (1994)の方法を一部改変し た系を用いた. 100μ LのLB培地を6.9mLの10mMリ ン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) に添加することでアッ セイ培地を調製し、37℃に加温し使用した. MG1655お よびYS40を、M9+トリプトン培地中で140rpm、37℃ で4時間培養した. 培養後、細胞を氷冷10mMリン酸 ナトリウム緩衝液 (pH7.4) で洗浄し、5×10⁶cells/mL となるように10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) で再懸濁した. 10μ Lの細胞懸濁液、 5μ LのLL-37溶液、 および35 μ Lのアッセイ培地を混合し、37℃で2時間イ ンキュベートした. 450 μ Lの氷冷150mM塩化ナトリウ ムを添加することで反応を停止した. 反応混合物を氷冷 10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) で段階希釈し、 LB 寒天培地に塗布した. プレートを 37℃で 22 時間イ ンキュベートし, colony forming unit (cfu) を算出した. 生存率は, LL-37 で処理した細胞の cfu を LL-37 未処理 の細胞の cfu で割ることで算出した.

ポリアミン定量

ポリアミン濃度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC)により定量した. HPLC分析および試料調製は, 以前に報告した方法と同様に行った (Sakanaka *et al.*, 2016).

培養上清サンプルの調製について、培養液 500 µLを 遠心分離し(18,700×g,4℃,5分),上清を回収した. タンパク質を除去するために、上清の1/10容量の 100% (*w*/*v*) トリクロロ酢酸を添加し、ボルテックス によりよく混合し、遠心分離した(18,700 ×g. 4℃, 5 分). 遠心分離後, 上清を回収し, HPLC に供した. 細 胞内ポリアミン測定用サンプルの調製では, OD₆₀₀=0.5(2 時間培養したサンプル) または OD₆₀₀=1(4~24 時間培 養したサンプル)あたり500µLの培養液を回収,遠心 分離 (18,700 ×g, 4℃, 5分) し、ペレットを1mLの 氷冷したグルコース含まない M9 最少培地で洗浄した. 洗浄後、ペレットを300µLの5% (w/v) トリクロロ酢 酸で懸濁し、100℃で15分間煮沸し細胞を破壊した. 煮 沸後, 懸濁液を遠心分離(21,500×g, 4℃, 15分)し, 上清を Cosmonice フィルター W(Nacalai Tesque) でフィ ルターろ過しHPLC分析に供した。遠心時に沈殿したタ ンパク質は300µLの0.1N水酸化ナトリウム溶液に溶解 し. Protein assav kit (Bio-Rad) を用いてタンパク質濃 度を定量した.得られたプトレッシン濃度はタンパク質 濃度で正規化し, nmol/mg of total cell protein として表 した.

安定同位体標識プトレッシン定量

安定同位体標識プトレッシンの量は、Chen らの方法 (2009)を一部改変しガスクロマトグラフィー-質量分 析(GC-MS)により行った.大腸菌株を安定同位体標識 L- $^{13}C_5$, $^{15}N_4$ アルギニン(S.I.Arg, Wako Pure Chemicals) を終濃度 1mM となるよう添加した M9+トリプトン培 地中で8時間培養した.培養上清に対して1/10量の 100% (w/v)トリクロロ酢酸と混合してタンパク質を 沈殿させた.次いで,試料を遠心分離(18,700×g,4°C, 35分)し、600 μ Lの上清に2mLのジエチルエーテルを 添加し、1分間ボルテックスすることで抽出を行った. 次いで,エマルジョンを遠心分離(18,700×g,4°C,5分) により分画し、脂質、炭水化物およびその他の夾雑物を 含有するジエチルエーテルを添加し、水層を洗浄した.この水層

を500µL分注し、内部標準として0.01% (w/v) 1.6-へ キサンジアミン(Kanto Chemical)を10uL添加し、 5M NaOHでpH11±0.5に調整した. ポリアミンのア ミノ基を N-エトキシカルボニル化する目的で、50 µLの エチルクロロホルメート (Kanto Chemical) を含む 1mLのジエチルエーテルをサンプル溶液に添加した. 混合物を室温で30分間振とうした後.4℃で5分間 15.000 ×gで遠心分離した. ポリアミン N-エトキシカ ルボニル誘導体を含有するジエチルエーテル層をスク リューキャップ付きのガラス管に移した. この誘導体化 反応を、50µLのエチルクロロホルメートを含有する 1mLのジエチルエーテルを遠心後の水層へ添加し再抽 出することによって繰り返した.2回の抽出で得られた ジエチルエーテル層を合一し、そして乾燥窒素流下で乾 燥した. 乾燥 N-エトキシカルボニルポリアミン誘導体 を100µLの酢酸エチルで溶解し、ここに200µLの無水 トリフルオロ酢酸 (Sigma-aldrich) を加えた. 密封ガ ラス管内の混合物を75℃の加熱ブロック上に1時間置 き、トリフルオロアセチル化反応を行い、次いで乾燥窒 素流下で完全に乾燥させた.誘導体を200µLの酢酸エ チルで再懸濁し、2uLをGC-MSに供した、GC-MS分析 は、キャリアガスとしてヘリウムを使用し、Equity-5キャ ピラリーカラム (30×0.25mm, 膜厚 0.25µm, Sigmaaldrich)を用いて行った.注入器および供給源の温度 はそれぞれ260および150℃とした.GCのグラジエン トは8℃/分で140~190℃まで加熱し、続いて4分間保 持し、次いで20℃/分で300℃まで加熱し、続いて4分 間保持した. 最後に. 20℃/分で320℃まで加熱し. 4 分間保持することで洗浄した. フラグメントイオンは selected ion monitoring mode $\vec{c} \in \exists p - l$, m/z + 355のイオンをプトレッシンの基本フラグメントとして使用 した. 抽出率および誘導体化率は1,6-ヘキサンジアミン を用いて標準化し、プトレッシン濃度は検量線を用いて 定量した.

結 果

プトレッシンエクスポーターのスクリーニング

プトレッシンエクスポーターをコードする遺伝子の欠 損株は、親株と比較して培養上清中のプトレッシン濃度 が低くなる、という仮説を立てスクリーニングを行った. Keio コレクション(Baba et al., 2006)より物質輸送系 に関連あるいは化合物のトランスポーターとしてアノ テーションが付けられている遺伝子の欠損株123株を入 手し、培養上清中のプトレッシン濃度を測定した (Fig.1A; Sugiyama et al., 2016).スクリーニングの結果、 AsapF株(JW1283)の培養上清のプトレッシン濃度が $\begin{array}{c}
80 \\
70 \\
60 \\
60 \\
50 \\
40 \\
30 \\
20 \\
10 \\
\end{array}$ Parental strain (BW25113) $\Delta sapD (JW 1284)$ $\Delta sapF (JW 1283)$

0

В

A



Fig. 1. Putrescine concentrations of culture supernatant of screened strains and depiction of putative *sapABCDF* operon. A, Putrescine concentrations of the culture supernatant of the screened strains. Bacterial strains were grown for 6 h at 37 °C with reciprocal shaking at 140 rpm in 5 ml of M9 + tryptone + succinate medium in a 20-ml test tube. Culture supernatant was harvested and subjected to HPLC analysis. Dots in the box plot indicate putrescine concentration of culture supernatant of tested mutants. The concentrations of putrescine of culture supernatant of parental strain (BW25113), Δ*sapD* (JW1284), and Δ*sapF* (JW1283) are indicated as solid dots.

B, Location of putative *sapABCDF* operon. Locations and directions of genes are indicated by arrows, and the annotations of genes are indicated below the arrows. Locations of *puuP* encoding putrescine importer (Kurihara *et al.*, 2009) and genes encoding enzymes for putrescine degradation pathway, the Puu pathway (Kurihara *et al.*, 2005; Kurihara *et al.*, 2006; Kurihara *et al.*, 2008; Kurihara *et al.*, 2009; Kurihara *et al.*, 2010; Nemoto *et al.*, 2012), are indicated by arrows. Locations of predicted promoters are shown by arrowheads; gray arrowheads indicate σ 54, and black arrowheads indicate σ 70. This figure is modified from Figure 1 of Sugiyama *et al.* (2016).

試験株の中で最も低く(18.6 μ M),次いで $\Delta sapD$ 株 (JW1284,25.5 μ M)であった.これらの値は,試験株 の親株(BW25113,48.8 μ M)またはスクリーニング結 果の中央値(48.7 μ M)よりも低かった(Fig.1A).こ れらの結果より, sapDおよび sapF がプトレッシン排出 に寄与すると予想された.

sapABCDFオペロン構成遺伝子の培養上清中のプトレッシン濃度への寄与

in silico 解析により, sapD および sapF は sapA, sapB, sapC, とともに sapABCDF オペロンを形成すると推測 された (Fig.1B). 大腸菌における sapABCDF の機能は 不明であり、いずれも ABC トランスポーターの構成タ ンパク質というアノテーションが付けられているのみで あった (Fig.1B). そこで, sapABCDF が新規プトレッシ ンエクスポーターをコードすると考え, ΔsapA, ΔsapBお よび ΔsapC 株の培養上清のプトレッシン濃度を測定した. *∆sapA*株の培養上清中のプトレッシン濃度(48.3µM)は、 親株とほぼ同等であった.一方で、AsapBおよび AsapC 株の培養上清のプトレッシン濃度は、親株の37% (18.2µM) および 47% (23.4µM) であった (Sugiyama et al., 2016). これらの結果より, 培養上清中のプトレッ シン濃度の減少は, sapB, sapC, sapD, および sapF 遺 伝子の欠損により生じ, sapA は培養上清中のプトレッ シンの減少に関与していないことが示された.

SapBCDF の抗菌ペプチド耐性への関与

Salmonella enterica sv. Typhimurium および Haemophilus influenzae において SapABCDF が抗菌ペプチドを取り込 む ABCトランスポーターであり、抗菌ペプチド耐性に 寄与することが報告されている(Parra-Lopez et al., 1993; Mason et al., 2006). そこで、大腸菌においても SapABCDF が抗菌ペプチド耐性に寄与していることが 予測されたため、抗菌ペプチド LL-37 に対する野生型株 (MG1655) および Δ sapBCDF 株 (YS40, MG1655 Δ sapBCDF)の感受性を評価した(Fig.2). この結果, いずれの株も LL-37 の濃度依存的に生存率が低下した が、MG1655 と YS40 の間で LL-37 に対する感受性に有 意な差は認められなかった(Fig.2). したがって、大 腸菌において SapBCDF は抗菌ペプチド LL-37 に対する 耐性に寄与していないことが示された.

sapBCDFの培養上清中のプトレッシン濃度への寄与

*sapBCDF*が培養上清中のプトレッシン濃度に与える影響を解析するために、親株YS111 (pACYC184/MG1655), *sapBCDF*欠損株YS112 (pACYC184/MG1655 *_sapBCDF*) および*sapBCDF*相補株YS113 (pACYC184-*sapB*+C+D+F+/ MG1655 ΔsapBCDF)を作製した. 各株について, 培養 上清および細胞内のプトレッシン濃度を経時的に定量し た(Fig.3). 生育による影響を除くため、培養上清中の プトレッシン濃度は細胞生育度 (OD₆₀₀) で (μM/OD₆₀₀), 細胞内のプトレッシン量はタンパク質量で正規化した (nmol/mg protein). YS111とYS112の生育に差は認め られなかったが、YS113の生育はYS111とYS112と比 較してわずかに良かった(Fig.3A). YS111とYS113の 培養上清のプトレッシン濃度は、培養開始4時間後で最 大に達し、それぞれ 41.9 および 38.4 µM/OD600 であった (Fig.3B). その後,培養開始12時間後には培養上清中 のプトレッシン濃度は0となった (Fig.3B). 一方, YS112の培養上清のプトレッシン濃度も培養開始4時間 後に最大値を示したが,26.2μM/OD₆₀₀(親株の63%) であった (Fig.3B). $sapB^+C^+D^+F^+$ (YS111とYS113) 株と sapBCDF 欠損株 (YS112) 間で培養開始 2 および 4 時間後の培養上清中のプトレッシン濃度に有意な差 (p<0.01) が認められた (Fig.3B). 対照的に, 細胞内 のプトレッシン量は sapBCDF の有無による変化は認め られなかった (Fig.3C). 以上の結果を総合すると, sapBCDFの欠損による培養上清のプトレッシン濃度の 減少(Fig.3B)がプトレッシン生合成量の減少による





Strains were incubated with different concentrations of LL-37. After incubation, the cells were plated, and the numbers of colonies were counted after incubation. Survival ratios were calculated by dividing the colony-forming units of strains incubated with LL-37 by those without LL-37. Closed and open squares indicate the mean survival ratio of MG1655 (parental strain) and YS40 (*sapBCDF* deleted strain), respectively. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three separated experiments. This figure is modified from Figure 2 of Sugiyama *et al.* (Sugiyama *et al.*, 2016).



Fig. 3. Effect of the deletion of *sapBCDF* on putrescine concentrations of culture supernatants. YS111 (parental strain), YS112 (*sapBCDF*-deleted strain), and YS113 (*sapBCDF*-complemented strain) were grown in M9+tryptone+succinate medium supplemented with 30μg/mL chloramphenicol.

A, Growth curves of strains. Closed, open, and gray squares represent the mean OD_{600} values of YS111, YS112, and YS113, respectively. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three separate experiments.

B, Changes of putrescine concentration in the culture supernatant of strains. Cultures were taken at different times after inoculation, and putrescine concentrations of culture supernatant were measured by HPLC. Putrescine concentrations were normalized by dividing the values of OD_{600} . Closed, open, and gray squares represent the mean of normalized putrescine concentrations of culture supernatant of YS111, YS112, and YS113, respectively. The means with different or the same letters are significantly different, respectively (a versus b, p < 0.01; c versus d, p < 0.01 according to Tukey's test).

C, Changes of intracellular putrescine concentration of strains. Cells were harvested at the indicated times, and putrescine concentrations in the cells were measured by HPLC and normalized to the amounts of protein in the cells. Closed, open, and gray squares represent the mean of normalized putrescine concentrations in the cell of YS111, YS112, and YS113, respectively. Data are expressed as the mean ± S.D. of three separate experiments. This figure is modified from Figure 3 of Sugiyama *et al.* (2016).

ものではないことが示唆された. 培養上清中のプトレッシン濃度はいずれの株においても培養開始4時間後から 急速に減少し始めた (Fig.3B).

我々は以前,培養上清中のプトレッシンの減少はプト レッシンインポーター PuuP によるプトレッシンの取り 込みにより引き起こされることを報告した (Kurihara et al., 2009). sapBCDFが培養上清中のプトレッシン濃度 に与える影響をより明確に示すために、puuP欠損を遺 伝子バックグラウンドに有する,SK627 (pACYC184/ MG1655 Δ*puuP*), SK628 (pACYC184/ MG1655 Δ*puuP* $\Delta sapBCDF$) および SK634 (pACYC184-sapB⁺C⁺D⁺F⁺/ MG1655 △puuP △sapBCDF)を作製した. SK627 と SK634 の生育はほぼ同等であった.しかし、SK628の生育度は SK634の生育度と比較して減少した(Fig.4A). SK627 とSK634の培養上清中のプトレッシン濃度は、培養開 始後それぞれ8もしくは10時間で最大に達し、それぞ れ103.4 および83.6µMであった(Fig.4B).一方で, SK628の培養上清中のプトレッシン濃度は、培養開始後 12時間で最大に達したが、わずか 33.6 µM (SK627 の 32%) であった(Fig.4B). 培養上清中のプトレッシン 濃度をOD₆₀₀の値で正規化(µM/OD₆₀₀)し比較を行っ

た結果,培養上清中のプトレッシン濃度は,やはり sapBCDFの存在に依存していた(Fig.4C).これらの結 果は, sapBCDFが培養上清のプトレッシン濃度に対し て重要な役割を果たすことを示していた.

sapBCDF欠損によるプトレッシンの取り込みへの影響

培養上清中のプトレッシン濃度はプトレッシン取り込 みの亢進によっても減少する.そこで、sapBCDFの欠 損によりプトレッシン取り込みが促進した可能性を検証 した.培養上清中のプトレッシンの減少の比較を容易に するために、プトレッシン生合成酵素をコードする speB および speC を破壊することで大腸菌によるプト レッシン産生を消失させた.すなわち、MG1655 $\Delta puuP$ $\Delta speB \Delta speC を 親株とし、YS233 (pACYC184/MG1655 \Delta puuP \Delta speB \Delta speC),YS234 (pACYC184/MG1655 <math>\Delta puuP \Delta speB \Delta speC \Delta sapBCDF)$ およびYS235 (pACYC184sapB*C*D*F*/MG1655 $\Delta puuP \Delta speB \Delta speC \Delta sapBCDF)$ を作出し、100 μ M のプトレッシンを添加した M9+トリ プトン培地で培養し、培養上清中のプトレッシン濃度を 経時的に測定した、YS234 の生育は回復した(Fig.5A).試





A, Growth curves of strains. Closed, open, and grey squares represent the mean of OD_{600} values of SK627, SK628, and SK634, respectively. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three separate experiments.

B and C, Changes of putrescine concentration of the culture supernatant of strains.

Cultures were taken at different times after inoculation, and putrescine concentrations of culture supernatant were measured by HPLC (B). The putrescine concentrations were normalized by dividing the values of OD_{600} (C). Closed, open, and grey squares represent the mean of normalized putrescine concentrations of culture supernatant of SK627, SK628, and SK634, respectively. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three separate experiments. This figure is modified from Supplementary figure S1 of Sugiyama *et al.* (2016).

験菌株の培養上清中のプトレッシン濃度はいずれの株に おいても経時的に減少したが、株間でのプトレッシン減 少量に有意差は認められなかった(Fig.5B).OD₆₀₀に よって正規化されたプトレッシン濃度の減少(µM/ OD₆₀₀)に関しても、培養開始8時間後で有意な差は認 められなかった(Fig.5C).これは、*sapBCDF*の欠失お よび相補が培地からのプトレッシンの取り込みに影響し なかったことを示唆する.まとめると、*sapBCDF*の欠 失による培養上清のプトレッシン濃度の減少(Figs. 3B, 4E および 4F)は、プトレッシン取り込みの促進による 結果ではなく、細胞内からのプトレッシン排出の減少に よるものであると考えられた.

SapBCDF を介したプトレッシンの排出

培養上清中のプトレッシンの増加が大腸菌細胞内から のSapBCDFを介したプトレッシン排出に起因すること を示すため、安定同位体標識アルギニン(S.I.Arg)を 用いたアッセイを行った.この実験の概略をFig.6Aに 示した.すなわち、S.I.Argはアルギニントランスポー

ターによって大腸菌に取り込まれ、SpeA(アルギニン デカルボキシラーゼ)および SpeB (アグマチンウレオ ヒドロラーゼ)により安定同位体標識プトレッシン (S.I.Put) に代謝されると予想される. 生じた S.I.Put が SapBCDFによって大腸菌細胞内から培地に排出された 場合、培養上清中のS.I.Putの濃度は、sapBCDFの欠損 および相補により変化すると予想される. そこで, SK627, SK628 および SK634 の培養上清中の S.I.Put 濃 度を測定した. この結果, SK627の培養上清中のS.I.Put 濃度は21.8µM/OD₆₀₀であったのに対し,SK628の培養 上清中のS.I.Put 濃度は8.3µM/OD₆₀₀であり,SK627と 比較して62%減少した (p<0.01, Tukey test). SK634 の培養上清中のS.I.Put 濃度は16.9µM/OD₆₀₀であり, SK628と比較して有意に高かった(*p*<0.01)(Fig.6B). 培養上清中の総プトレッシン濃度(S.I.Put と未標識プ トレッシンの合計)は、S.I.Put 濃度と同様の傾向を示 した (Fig.6B および 6C). 試験した3株において, 安 定同位体標識および非標識プトレッシンの比率に差は認 められず, sapBCDFの有無によるアルギニン代謝への



Fig. 5. Effect of the deletion of *sapBCDF* on putrescine uptake from the medium.

YS233 (pACYC184/ $\Delta speB \Delta speC \Delta puuP$ parental strain), YS234 (*sapBCDF*-deleted strain), and YS235 (*sapBCDF*-complemented strain) were grown in M9 + tryptone medium supplemented with $30\mu g/ml$ chloramphenicol and $100\mu M$ putrescine, and growth of strains was measured OD₆₀₀.

A, Growth curves of strains. Closed, open, and gray squares represent the mean of OD_{600} values of YS233, YS234, and YS235, respectively. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three separate experiments.

B, Uptake of putrescine from culture by tested strains. Cultures were taken at different times after inoculation, and putrescine concentration of culture supernatant was measured by HPLC. Closed, open, and gray squares represent the mean of putrescine concentration of culture supernatant of YS233, YS234, and YS235, respectively.

C, Decreases of putrescine in the culture supernatants of tested strains. First, a decrease of putrescine concentration during the culture was calculated by subtracting putrescine concentration (μ M) of culture supernatant at 8 h after inoculation from 100 μ M, which is the original putrescine concentration of the medium used in this experiment. Then, the decreases (μ M) were normalized by dividing the values of OD₆₀₀. Black, white, and gray bars represent the normalized decrease of putrescine concentration of culture supernatant of YS233, YS234, and YS235, respectively. This figure is modified from Figure 4 of Sugiyama *et al.* (2016).



Fig. 6. Effect of the deletion of *sapBCDF* on the concentration of culture supernatant of stable isotope-labeled putrescine derived from stable isotope-labeled arginine supplemented to the medium. SK627 (pACYC184/△*puuP*, parental strain), SK628 (*sapBCDF*-deleted strain), and SK634 (*sapBCDF*-complemented strain) were grown in M9 + tryptone medium supplemented with 30µg/ml chloramphenicol and 1 mM S.I.Arg. Cultures were harvested at 8h after inoculation. Analysis of S.I.Put of the culture supernatant was performed by GC-MS, and putrescine concentration was quantified using a standard curve and internal standard methods. Data are expressed as the mean ± S.D. of three separated experiments.

A, Schematic illustration of the experiment. Gray circles indicate stable isotope-labeled atoms.

B and C, Concentration of S.I.Put (B) and total putrescine, and sum of S.I.Put and native putrescine (C) of culture supernatant of SK627, SK628, and SK634. The columns with different letters are significantly different (a versus b, p < 0.01; a versus c, p < 0.05; b versus c, p < 0.01 according to Tukey's test).

D, Ratio of S.I.Put to total putrescine of SK627, SK628, and SK634.

This figure is modified from Figure 5 of Sugiyama et al. (Sugiyama et al., 2016).

影響はなかったことが示唆された(Fig.6D). これらの 結果より, SapBCDFを介したプトレッシン排出が生じ ていることが示された.

考 察

本研究では、SapBCDF が中性の生育条件下で機能す

る大腸菌のプトレッシンエクスポーターであることを明 らかにした.これまでに、大腸菌の MdtJI (Higashi et al., 2008) および Bacillus subtilis の Blt (Woolridge et al., 1997) がスペルミジンエクスポーターとして報告さ れ、さらに、Shigella flexneri では、MdtJI はプトレッシ ンエクスポーターであることが報告されている (Leuzzi et al., 2015).これまでに、大腸菌は酸性の生育条件下 でPotEを介してプトレッシンを培養上清へ排出するこ とが報告されている(Kashiwagi et al., 1997). しかし ながら、中性の生育条件下でも大腸菌がPotE 非依存的 にプトレッシンを培養上清に排出することが報告されて おり(Schiller et al., 2000), これはPotE 以外の新規プ トレッシンエクスポーターが大腸菌に存在することを示 唆していた.本研究により SapBCDF が大腸菌の中性の 生育条件下でのプトレッシン排出において主要な役割を 果たすことが明らかとなった.

エクスポーターの機能解析では、反転膜小胞 (Kashiwagi et al., 1992)またはエクスポーターを含む プロテオリポソームを使用するのが理想的である (Sasahara et al., 2011).しかしながら、調製の技術的な 困難さのためにこれらの方法を使用せずにエクスポー ターと同定したという報告も存在する(Pathania & Sardesai, 2015).本研究では、反転膜小胞とプロテオリ ポソームが利用できなかったため、速度論的パラメータ は決定できなかった.しかし、S.I.Argを用いることで、 S.I.Arg から大腸菌の代謝により生じた S.I.Put 量を測定 することでプトレッシンが SapBCDF によって細胞内か ら培養上清へ排出されることを示した(Fig.6).

SapABCDF は γ-Proteobacteria 綱内でよく保存されて いる. これまでに、SapABCDFがLL-37、β-ディフェン シンおよびプロタミンといったカチオン性抗菌ペプチド に対する細菌の耐性に寄与することが報告されている (Parra-Lopez et al., 1993; Shelton et al., 2011). Parra-Lopez et al., (1993) lt, S. enterica sv. Typhimurium △*sapABCDF*株が親株よりもプロタミンに対して感受性 が高いことを報告し, S. enterica sv. Typhimurium は抗菌 ペプチドを細胞内に取り込みペプチダーゼで分解してい るという仮説を立てた. この仮説は, LL-37とβ-ディフェ ンシンを用いて H. influenzae において実験的に証明され ている (Shelton et al., 2011). 大腸菌と S. enterica sv. Typhimuriumの SapABCDF タンパク質は非常に高い相 同性を有している (SapA, 90%; SapB, 92%; SapC, 95%; SapD, 96%; SapF, 98%). それにもかかわらず, 大腸菌の SapBCDF は抗菌ペプチド LL-37 に対する耐性 に寄与しないことが示された(Fig.2).

大腸菌 SapABCDF の機能に関して、本研究以前では 唯一 SapD (TrkE としても知られている) がカリウム トランスポーター TrkH および TrkG の ATP アーゼとし て機能しているという報告がされていた (Harms et al., 2001). H. influenzae において大腸菌と同様に、sapD 欠 損によりカリウムの取り込みが減少することが報告され ている (Mason et al., 2006). これまでの研究により, 植物や動物において細胞内ポリアミンが環境中からのカ リウムの取り込みを抑制することが報告されている (Lopatin *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2000; Vandenberg, 2008).
 したがって、大腸菌において、SapDのATPアーゼ活性 により駆動される TrkH および TrkG によるカリウム取 り込みと SapBCDF によるプトレッシン排出の間に関係 性がある可能性が示唆された.

ポリアミンは細胞増殖に重要であるため、細菌の細胞 内のポリアミン濃度は対数増殖期で高く. 定常期で低く なる(Fig.3C) (Igarashi & Kashiwagi, 2000; Sakanaka et al., 2016). また、細胞内のポリアミンは分解と排出 により減少する. Puu 経路は、定常期の初期に機能する プトレッシン分解経路である(Kurihara et al., 2005; Kurihara et al., 2006; Kurihara et al., 2008; Kurihara et al., 2009; Kurihara et al., 2010; Nemoto et al., 2012). プトレッ シン排出を担う satBCDF とプトレッシン分解に寄与す る puu 遺伝子クラスターの制御が協調的に行われた場 合、細胞内のプトレッシンは、対数増殖期から定常期に かけて大きく減少する.大腸菌の染色体上で sapBCDF 遺伝子クラスターと puu 遺伝子クラスターは隣接して存 在しているため (Fig.1B), sapBCDFと puu 遺伝子クラ スターが協調的に機能し、対数増殖期から定常期にかけ て細胞内のプトレッシン量を制御していると予想される.

本研究において、プトレッシンの排出は、sapAの欠 損により阻害されなかった (Sugiyama et al., 2016). SapAはABCトランスポーターのペリプラズム基質結合 タンパク質としてアノテーションされているため, SapAが細胞内から培養上清へのプトレッシン排出に関 与していないことは論理的であるといえる. S. enterica sv. Tvbhimuriumの sabABCDF はポリシストロニックな 発現をすることが報告されている(Parra-Lopez et al., 1993). しかしながら、大腸菌 sapABCDF において推定 された sapA のプロモーターは sapBCDF と独立して位置 しており (Fig.1B), さらに, 推定σ因子に関しても sapAが σ^{70} であったのに対し、sapBCDFは σ^{54} であった. これらの結果より sapAと sapBCDF が別々に発現する可 能性が強く示唆され,SapBCDFとSapAがそれぞれ異 なる機能を有すると考えられた.本研究は, SapB, SapCおよびSapFの機能を同定した最初の報告として、 大腸菌の SapBCDF がプトレッシンを細胞内から培養上 清に排出することを示した(Fig.3,4および6). さらに, 大腸菌の SapBCDF は抗菌ペプチド LL-37 に対する耐性 に寄与してないことを示した (Fig.2).

しかし、Δ*puuP*ΔsapBCDF株の培養上清中に依然とし てプトレッシンが検出され(Fig.4B,6Bおよび6C),大 腸菌がSapBCDF以外のプトレッシンエクスポーターを 有していることが示唆された. 今後,腸内細菌のモデル 生物である大腸菌におけるプトレッシン排出のメカニズ ムをさらに研究する必要があると考えられる.

要 約

Keioコレクションを用いたスクリーニングにより、 中性の生育条件で機能する大腸菌の新規プトレッシン エクスポーターの一つとして SapBCDF を同定した.他 の細菌種と異なり、大腸菌では SapBCDF は抗菌ペプチ ド耐性に寄与していないことが示された. 今後、 SapBCDF が腸管内でのプトレッシン産生を制御する上 で標的になることが期待される.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 杉山友太, 中村篤央, 松本光晴, 神戸亜也香, 鈴木秀之, 東恭 平, 五十嵐一衛, 片山高嶺, 栗原新. 2015. 大腸菌の新規プ トレッシンエクスポーター SapBCDF. ポリアミンと核酸 の共進化 第13回合同シンポジウム. 9月12日. 東京.
- 2) 杉山友太,中村篤央,松本光晴,神戸亜也香,鈴木秀之,東恭 平,五十嵐一衛,片山高嶺,栗原新. 2015. 大腸菌の新規プ トレッシンエクスポーター SapBCDF. 第8回北陸合同バ イオシンポジウム. 10月30-31日. 石川.
- 3) 杉山友太、中村篤央、松本光晴、神戸亜也香、鈴木秀之、東恭 平、五十嵐一衛、片山高嶺、栗原新.2015. 大腸菌の新規プ トレッシンエクスポーター SapBCDFの同定と抗菌ペプチ ド耐性への影響の検討.日本ポリアミン学会第7回年会. 11月13-14日.京都.
- 4) 杉山友太,中村篤央,松本光晴,神戸亜也香,鈴木秀之,阪中 幹祥,東恭平,五十嵐一衛,片山高嶺,栗原新. 2016. 大腸 菌の新規プトレッシンエクスポータ- SapBCDFの同定と 抗菌ペプチド耐性への影響.第9回北陸合同バイオシンポ ジウム. 11月45日.福井.
- 5) 杉山友太, 中村篤央, 松本光晴, 神戸亜也香, 阪中幹祥, 東恭 平, 五十嵐一衛, 片山高嶺, 鈴木秀之, 栗原新. 2017. 大腸 菌の新規プトレッシンABCエクスポーター SapBCDF. 日 本ポリアミン学会第8回年会. 1月20-21日. 千葉.
- 6) 杉山友太,中村篤央,松本光晴,神戸亜也香,阪中幹祥,東恭 平,五十嵐一衛,片山高嶺,鈴木秀之,栗原新. 2017. 大腸菌 の新規プトレッシン排出タンパク SapBCDFの同定. 2017 年度日本農芸化学会. 3月17-20日. 京都.
- 7) Sugiyama, Y., Nakamura, A., Matsumoto, M., Kanbe, A., Sakanaka, M., Higashi, K., Igarashi, K., Katayama, T., Suzuki, H. & Kurihara, S. 2017. A novel putrescine exporter SapBCDF of *Escherichia coli*. The 2017 Gordon research conference on polyamines. June 25-30. Waterville valley, USA.
- 8) 杉山友太,中村篤央,松本光晴,神戸亜也香,鈴木秀之,阪中 幹祥,東恭平,五十嵐一衛,片山高嶺,栗原新. 2017. 大腸 菌の新規プトレッシンエクスポーター SapBCDF の同定. 第12回トランスポーター研究会年会.7月8-9日. 宮城.
- 9) 杉山友太,中村篤央,松本光晴,神戸亜也香,鈴木秀之,阪中 幹祥,東恭平,五十嵐一衛,片山高嶺,栗原新. 2017. 大腸 菌の新規プトレッシンエクスポーター SapBCDF. 北陸の 微生物研究. 8月31日. 石川.

原著論文

 Sugiyama, Y., Nakamura, A., Matsumoto, M., Kanbe, A., Sakanaka, M., Higashi, K., Igarashi, K., Katayama, T., Suzuki, H. & Kurihara, S. 2017. A novel putrescine exporter SapBCDF of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **291**: 26343 – 26351.
 許 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所寄付講座助成金(平 成25年10月~31年3月)により行われたものである. 本助成を賜った公益財団法人発酵研究所に厚く御礼申し 上げます.また,本研究の一部は生研センター・イノベー ション創出基礎的研究推進事業の助成により行われまし た.また,Keioコレクションを分譲頂いたNBRP大腸 菌事業(NIG)に御礼申し上げます.

文 献

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. & Mori, H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol. Syst. Biol. 2: 2006.0008.
- Chen, G.G., Turecki, G. & Mamer, O.A. 2009. A quantitative GC-MS method for three major polyamines in postmortem brain cortex. J. Mass. Spectrom. 44: 1203-1210.
- Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 6640-6645.
- Furuchi, T., Kashiwagi, K., Kobayashi, H. & Igarashi, K. 1991. Characteristics of the gene for a spermidine and putrescine transport system that maps at 15 min on the *Escherichia coli* chromosome. J. Biol. Chem. **266**: 20928-20933.
- Goodwin, A.C., Destefano Shields, C.E., Wu, S., Huso, D.L., Wu, X., Murray-Stewart, T.R., Hacker-Prietz, A., Rabizadeh, S., Woster, P.M., Sears, C.L. & Casero, R.A.Jr. 2011. Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*induced colon tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108: 15354-15359.
- Grenier, F., Matteau, D., Baby, V. & Rodrigue, S. 2014. Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BW25113. Genome Announc 2: pii: e01038-14.
- Harms, C., Domoto, Y., Celik, C., Rahe, E., Stumpe, S., Schmid, R., Nakamura, T. & Bakker, E.P., 2001. Identification of the ABC protein SapD as the subunit that confers atp dependence to the K⁺-uptake systems Trk(H) and Trk(G) from *Escherichia coli* K-12. Microbiology. **147**: 2991-3003.
- Harwig, S.S., Ganz, T. & Lehrer R.I. 1994. Neutrophil defensins: purification, characterization, and antimicrobial testing. Methods in Enzymology, 236: 160-172.
- Higashi, K., Ishigure, H., Demizu, R., Uemura, T., Nishino, K., Yamaguchi, A., Kashiwagi, K. & Igarashi, K. 2008. Identification of a spermidine excretion protein complex (MdtJI) in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **190**: 872-878.
- Igarashi, K. & Kashiwagi, K. 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. Biochem. Biophys. Res. Commun.
271: 559-564.

- Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Suzuki, F., Kobayashi, H. & Igarashi, K. 1992. Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the potE gene of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **89**: 4529-4533.
- Kashiwagi, K., Shibuya, S., Tomitori, H., Kuraishi, A. & Igarashi, K. 1997. Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **272**: 6318-6323.
- Kibe, R., Kurihara, S., Sakai, Y., Suzuki, H., Ooga, T., Sawaki, E., Muramatsu, K., Nakamura, A., Yamashita, A., Kitada, Y., Kakeyama, M., Benno, Y. & Matsumoto, M. 2014. Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. Sci. Rep. 4: 4548.
- Kurihara, S., Kato, K., Asada, K., Kumagai, H. & Suzuki, H. 2010. A putrescine-inducible pathway comprising PuuE-YneI in which gamma-aminobutyrate is degraded into succinate in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **192**: 4582-4591.
- Kurihara, S., Oda, S., Kato, K., Kim, H.G., Koyanagi, T., Kumagai, H. & Suzuki, H. 2005. A novel putrescine utilization pathway involves gamma-glutamylated intermediates of *Escherichia coli* K-12. J. Biol. Chem. **280**: 4602-4608.
- Kurihara, S., Oda, S., Kumagai, H. & Suzuki, H. 2006. Gammaglutamyl-gamma-aminobutyrate hydrolase in the putrescine utilization pathway of *Escherichia coli* K-12. FEMS. Microbiol. Lett. 256: 318-323.
- Kurihara, S., Oda, S., Tsuboi, Y., Kim, H.G., Oshida, M., Kumagai, H. & Suzuki, H. 2008. gamma-Glutamylputrescine synthetase in the putrescine utilization pathway of *Escherichia coli* K-12. J. Biol. Chem. 283: 19981-19990.
- Kurihara, S., Suzuki, H., Oshida, M. & Benno, Y. 2011. A novel putrescine importer required for type 1 pili-driven surface motility induced by extracellular putrescine in *Escherichia coli* K-12. J. Biol. Chem. **286**: 10185-10192.
- Kurihara, S., Tsuboi, Y., Oda, S., Kim, H.G., Kumagai, H. & Suzuki, H. 2009. The putrescine Importer PuuP of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **191**: 2776-2782.
- Leuzzi, A., Di Martino, M.L., Campilongo, R., Falconi, M., Barbagallo, M., Marcocci, L., Pietrangeli, P., Casalino, M., Grossi, M., Micheli, G., Colonna, B. & Prosseda, G. 2015. Multifactor regulation of the MdtJI polyamine transporter in *Shigella*. PLoS One **10**: e0136744.
- Liu, K., Fu, H., Bei, Q. & Luan, S. 2000. Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. Plant Physiol. 124: 1315-1326.
- Lopatin, A.N., Makhina, E.N. & Nichols, C.G. 1994. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. Nature 372: 366-369.
- Mason, K.M., Bruggeman, M.E., Munson, R.S. & Bakaletz, L.O. 2006. The non-typeable *Haemophilus influenzae* Sap transporter provides a mechanism of antimicrobial peptide resistance and SapD-dependent potassium acquisition. Mol. Microbiol. **62**: 1357-1372.
- Matsumoto, M., Kibe, R., Ooga, T., Aiba, Y., Kurihara, S., Sawaki, E., Koga, Y. & Benno, Y. 2012. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. Sci. Rep. 2:233.
- Matsumoto, M., Kurihara, S., Kibe, R., Ashida, H. & Benno, Y. 2011. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation

of gut bacterial polyamine production. PLoS One 6: e23652.

- Miller, J.H. 1972. A short course in bacterial genetics. *In* A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and bacteria. p.247-263 and 437, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Habor Laboratory Press.
- Nemoto, N., Kurihara, S., Kitahara, Y., Asada, K., Kato, K. & Suzuki, H. 2012. Mechanism for regulation of the putrescine utilization pathway by the transcription factor PuuR in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **194**: 3437-3447.
- Parra-Lopez, C., Baer, M.T. & Groisman, E.A. 1993. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. EMBO. J. 12: 4053-4062.
- Pathania, A. & Sardesai, A.A. 2015. Distinct paths for basic amino acid export in *Escherichia coli*: YbjE (LysO) mediates export of L-Lysine. J. Bacteriol. **197**: 2036-2047.
- Pegg, A.E. 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. IUBMB Life 61: 880-894.
- Pistocchi, R., Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Nukui, E., Sadakata, Y., Kobayashi, H. & Igarashi, K. 1993. Characteristics of the operon for a putrescine transport system that maps at 19 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. J. Biol. Chem. 268: 146-152.
- Sakanaka, M., Sugiyama, Y., Kitakata, A., Katayama, T. & Kurihara, S. 2016. Carboxyspermidine decarboxylase of the prominent intestinal microbiota species *Bacteroides thetaiotaomicron* is required for spermidine biosynthesis and contributes to normal growth. Amino Acids 48: 2443-2451.
- Sasahara, A., Nanatani, K., Enomoto, M., Kuwahara, S. & Abe, K. 2011. Substrate specificity of the aspartate:alanine antiporter (AspT) of *Tetragenococcus halophilus* in reconstituted liposomes. J. Biol. Chem. **286**: 29044-29052.
- Schiller, D., Kruse, D., Kneifel, H., Krämer, R. & Burkovski, A. 2000. Polyamine transport and role of *potE* in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **182**: 6247-6249.
- Shelton, C.L., Raffel, F.K., Beatty, W.L., Johnson, S.M. & Mason, K.M. 2011. Sap transporter mediated import and subsequent degradation of antimicrobial peptides in *Haemophilus*. PLoS Pathog. 7: e1002360.
- Sugiyama, Y., Nakamura, A., Matsumoto, M., Kanbe, A., Sakanaka, M., Higashi, K., Igarashi, K., Katayama, T., Suzuki, H. & Kurihara, S. 2016. A novel putrescine exporter SapBCDF of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **291**: 26343-26351.
- Tabor, C.W. & Tabor, H. 1985. Polyamines in microorganisms. Microbiol. Rev. 49: 81-99.
- Tiburcio, A.F., Altabella, T., Bitrián, M. & Alcázar, R. 2014. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. Planta 240: 1-18.
- Vandenberg, C.A. 2008. Integrins step up the pace of cell migration through polyamines and potassium channels. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105: 7109-7110.
- Woolridge, D.P., Vazquez-Laslop, N., Markham, P.N., Chevalier, M.S., Gerner, E.W. & Neyfakh, A.A. 1997. Efflux of the natural polyamine spermidine facilitated by the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Blt. J. Biol. Chem. **272**: 8864-8866.
- Wortham, B.W., Patel, C.N. & Oliveira, M.A. 2007. Polyamines in bacteria: pleiotropic effects yet specific mechanisms. Adv. Exp. Med. Biol. 603: 106-115.

Bacteroides 属細菌におけるポリアミン生合成系遺伝子の機能解析

阪中 幹祥, 片山 高嶺, 栗原 新

石川県立大学生物資源環境学部寄付講座腸内細菌共生機構学 〒921-8836 石川県野々市市末松1-308

Functional analysis of polyamine biosynthetic genes in genus Bacteroides

Mikiyasu Sakanaka, Takane Katayama, Shin Kurihara

Host-Microbe Interaction Research Laboratory Faculty of Bioresources and Environmental Sciences Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

Recent studies indicate that polyamines in the gut are produced by hundreds of gut bacterial species and are closely associated with host health. However, the molecular mechanisms of the polyamine biosynthesis in human gut bacteria have been poorly understood. In this study, we analyzed the functions of polyamine biosynthetic genes in genus *Bacteroides*, human gut symbionts, using gene manipulation tools. Markerless deletion of carboxyspermidine decarboxylase gene *casdc* led to depletion of intracellular spermidine in *Bacteroides thetaiotaomicron*. Disruption of arginine decarboxylase gene *speA* in *Bacteroides dorei* resulted in the decreased concentration of spermidine in the cells and culture supernatant. These two mutants also showed the delayed growth. Collectively, our results indicate that *casdc* and *speA* are the main genes involved in spermidine biosynthesis in genus *Bacteroides*.

Key words: arginine decarboxylase, carboxyspermidine decarboxylase, gut bacteria, polyamine, spermidine

緒 言

ポリアミンは2つ以上のアミノ基を含む脂肪族炭化水 素の総称であり、代表的なものとしてプトレッシン、ス ペルミジンおよびスペルミンが挙げられる.ポリアミン は、生物の様々の部位に存在しており、ヒトの大腸腸管 内腔においても検出される(Tabor & Tabor, 1985; Michael, 2015). 腸管内腔に存在するポリアミンは腸内 細菌によって生合成・輸送されたものであることが示唆

E-mail:

- 阪中幹祥(miksak@dtu.dk)(現所属:National Food Institute, Technical University of Denmark, Kemitorvet, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark),
- 片山高嶺(katayama.takane.6s@kyoto-u.ac.jp)(現所属:京都 大学大学院生命科学研究科 〒 606-8502 京都市左京 区北白川追分町),
- 栗原 新(skurihara@waka.kindai.ac.jp)(現所属:近畿大学生 物理工学部 〒 649-6433 和歌山県紀の川市)
- 共同研究者

- 奈良未沙希 (石川県立大学生物資源環境学部),
- 北方 彩 (石川県立大学生物資源環境学部)

されており(Matsumoto *et al.*, 2012), それらは宿主の 健康に大きな影響を及ぼしていることが報告されている (Upp *et al.*, 1988; Matsumoto *et al.*, 2011; Kibe *et al.*, 2014). このことから, 腸内細菌を介した腸内ポリアミ ン濃度制御の重要性が近年高まりつつあり, これを達成 するには腸内細菌による生合成・輸送の理解が不可欠で あると考えられている.

バクテリアのポリアミン生合成経路は大腸菌を中心に 研究されているものの(Tabor & Tabor, 1985), この細 菌種はヒト腸内においては菌数が極めて少ない.また, Bacteroides 属細菌のようなヒト腸内常在菌叢最優勢種 (Qin et al., 2010)は大腸菌とは異なるポリアミン生合 成経路を有すると推測されているが(Fig.1)(Hanfrey et al., 2011; Sugiyama et al., 2017),現在までに当該ポリ アミン生合成経路の実験的な証明は行われていない.本 研究では遺伝子操作技術を駆使して,Bacteroides thetaiotaomicron および Bacteroides doreiのポリアミン生 合成経路の一端を明らかにすることにより,ヒト腸内常 在菌叢最優勢種におけるポリアミン生合成への理解を深 めることを目指した.

杉山友太 (京都大学大学院農学研究科),



Spermidine

Fig. 1. Predicted polyamine biosynthetic pathway in genus Bacteroides. SpeA, arginine decarboxylase; AIH, agmatine deiminase/iminohydrolase; NCPAH, N-carbamoylputrescine amidohydrolase; CASDH, carboxyspermidine dehydrogenase; CASDC, carboxyspermidine decarboxylase.

実験方法

菌株、培養方法および培地

大腸菌は、過去の報告のように λpir 株を用いて (Koropatkin *et al.*, 2008), Luria–Bertani 培地にて37℃ で培養した. *Bacteroides* 属細菌は嫌気チャンバーInvivO₂ 400 (10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂; Ruskinn Technology) 内で、37℃で嫌気的に培養した. *B. thetaiotaomicron* の 培養は、主に GAM 培地(Nissui Pharmaceutical)また は合成培地(Koropatkin *et al.*, 2008)(以後、ポリアミ ンフリー培地)で行った. *B. dorei* の培養は、主に GAM 培地または 10% (v/v) GAM を添加した合成培地[以後、 ポリアミン低濃度培地(3 μ M プトレシン、2 μ M スペル ミジンおよび 1 μ M スペルミン)]で行った. また必要に 応じて、アンピシリン(100 μ g/mL),エリスロマイシ ン (25 μ g/MI)、ゲンタマイシン(200 μ g/mL)および 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン(FUdR; 200 μ g/mL) を培地に添加した.

接合伝達による Bacteroides 属細菌の形質転換

エリスロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドを保持 する大腸菌 λpir 株および Bacteroides 属細菌をそれぞれ 培養し,培養菌体を混合した後,10%馬無菌脱繊血 (Nippon Bio-Supp. Center)を含むブレインハートイン フュージョン寒天培地(Sigma-Aldrich)に塗抹した. 24時間好気条件でインキュベートし接合伝達を行った 後,形成したコロニーをGAM液体培地(Nissui)で懸 濁し,エリスロマイシンおよびゲンタマイシンを含む前 述の寒天培地に塗抹した.インキュベート後,寒天培地 上で形成したコロニー,すなわちエリスロマイシン耐性 遺伝子を含むプラスミドを保持する Bacteroides 属細菌 を取得した.なお, Bacteroides 属細菌はゲンタマイシン 耐性を持つが,大腸菌は当該耐性を有していない.

B. thetaiotaomicron の遺伝子欠損株および遺伝子相補株 の作製

Bacteroides 属細菌では、二重相同組換えによるマー カーレス遺伝子欠損を行うために、カウンターセレク ションマーカーであるチミジンキナーゼ遺伝子 tdk と宿 主株である Δtdk 株がよく用いられている(Koropatkin et al., 2008; Wexler et al., 2016). Δtdk 株は FUdR 耐性を 有しているが、本株への tdk の導入は FUdR 感受性を付 与するので, tdk 遺伝子はカウンタセレクションマーカー として利用することができる. これにより、2回目の相 同組換え体を容易に選択することが可能となる.

上述のシステムを利用して, B. thetaiotaomicron Δtdk (Koropatkin et al., 2008)のカルボキシスペルミジンデ

カルボキラーゼ遺伝子 casdc (Fig.1) を二重相同組換え 法によって破壊した. プラスミドの構築には、一貫して In-Fusion HD クローニングキット (Clontech Laboratories) を用いた. casdc 欠損用プラスミドは. casdc 遺伝子の上 流と下流領域を, tdk を含むプラスミド pExchange-tdk (Koropatkin et al., 2008)の Sall 部位に挿入することで構 築した. これらの上流と下流の領域は B. thetaiotaomicron JCM 5827^T ゲノム DNA をテンプレートとして PCR 増幅 した. 使用したプライマーは Sakanaka et al. (2016)の Table 1 に記載の通りである.構築した casdc 欠損用プラ スミドは接合伝達によって B. thetaiotaomicron ∆tdk に導 入し、プラスミドが casdc の上流また下流のいずれかに 挿入された株(tdkを染色体上に保持する1回目の相同 組み換え体)を取得した. その後, 1回目の相同組み換 え体の培養液をFUdR含有寒天培地に塗抹し、2回目の 相同組み換え体(相同組換えによって tdk が染色体上か ら脱落することにより, Bacteroides 属細菌に FUdR 耐性 能が付与される)を取得した. casdc 遺伝子欠損変異の 導入はPCRにより確認し、得られた株を casdc 欠損株 $(\Delta tdk \Delta casdc) \geq lt.$

casdc 相補用のプラスミドは, casdc 遺伝子を, PstI お よび NotI 消化したプラスミドpNBU2-bla-ermGb (Koropatkin et al., 2008) に挿入することにより構築し た. casdc 遺伝子は B. thetaiotaomicron JCM 5827^T ゲノ ムDNA をテンプレートとして PCR 増幅した.使用した プライマーは Sakanaka et al. (2016)の Table 1 に記載の 通りである.構築した casdc 相補用プラスミドは接合伝 達によって casdc 欠損株 ($\Delta tdk \Delta casdc$)に導入し、プラ スミドが NBU2 att1 部位(tRNA^{Ser} 遺伝子 BT_t70)に挿 入された株を取得した.得られた株を casdc 相補株(Δtdk $\Delta casdc att1:casdc⁺$)とした.

B. dorei の遺伝子欠損株の作製

B. dorei においては Δtdk 株がなかったため、まず B. dorei JCM 13471^Tの tdk 遺伝子を上述のように二重相同 組換え法によって破壊した. tdk 欠損用プラスミドは、 tdk 遺伝子の上流と下流領域を PstI および SalI 消化した プラスミド pKNOCK-bla-ermGb (Koropatkin et al., 2008) に挿入することで構築した. これらの上流と下流の領域 は B. dorei JCM 13471^T ゲノム DNA をテンプレートとし て PCR 増幅した. 使用したプライマーは Sakanaka et al. (2018)の Table 1 に記載の通りである. 構築した tdk 欠損用プラスミドは接合伝達によって B. dorei JCM 13471^T に導入し、さらに上述のように二重相同組換え により B. dorei Δtdk 株 (親株)を作出した. tdk 遺伝子 の欠損は PCR によって確認した.

続いて、カウンターセレクションマーカー tdk と Δtdk

株を用いて、上述と同様の方法により B. doreiの speA 遺伝子を破壊した. speA 欠損用プラスミドは speA 遺伝 子の上流と下流領域を PstI および SalI 消化したプラス ミド pExchange-tdk (Koropatkin et al., 2008) に挿入する ことで構築した. これらの上流と下流の領域は B. dorei JCM 13471^T ゲノム DNA をテンプレートとして PCR 増 幅した. 使用したプライマーは Sakanaka et al. (2018) の Table 1 に記載の通りである. 構築した speA 欠損用プ ラスミドは接合伝達によって B. dorei Δtdk (親株) に導 入し、さらに上述のように二重相同組換えにより speA 欠損株 (Δtdk ΔspeA) を作出した. speA 遺伝子の欠損 は PCR によって確認した.

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

ポリアミン濃度を測定するために、陽イオン交換カラ ム (カラム温度 67℃, #2619PH, 4.6×50mm; Hitachi) を装着した HPLC システム (Chromaster, Hitachi) を使 用した.ポリアミンの溶出には、移動相A(45.2mMク エン酸三ナトリウム, 63.3mM 塩化ナトリウム, 60.9mM クエン酸)および移動相B(200mMクエン酸三ナトリ ウム.2M塩化ナトリウム.5%エタノール.5%1-プ ロパノール)を使用した.移動相Bの濃度は、0-6分の 間に50から85%に直線的に上げ、6-12分の間は85% で維持した. 12-18分の間に100%にまで上げ, 18-45 分の間は100%で維持した. その後, 45-60分の間に 50%にまで下げた. 溶出したポリアミンは、ポストカ ラム法によりo-フタルアルデヒドで誘導体化し、蛍光 検出器(λ ex 340nm. λ em 435nm)を用いて検出した. ポリアミンの誘導体化は、反応溶液1(0.4N水酸化ナ トリウム)および反応溶液2(234mMホウ酸, 0.05% Brij-35, 5.96 mM o-フタルアルデヒド, 0.2% 2-メルカプ トエタノール)を67℃で溶出液と混合することで行っ た、各ポリアミンの濃度は、既知濃度の標準物質を用い て作成した検量線に基づいて計算した.

HPLC による細胞内および培養上清中のポリアミン分析

B. thetaiotaomicron をポリアミンフリー培地にて,または, B. doreiをポリアミン低濃度培地にて培養した. その後,経時的に培養液を回収し,遠心分離により菌体および培養上清を取得した.

細胞内ポリアミンは以下のように分析した.回収した 菌体をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した(18,700×g, 4℃,5分).菌体を300 μ Lの5%(w/v)トリクロロ酢酸 に再懸濁し,煮沸した水中で15分間インキュベートし た.遠心分離(18,700×g,4℃,5分)後,上清をコス モナイスフィルターW(Nacalai Tesque)により濾過し, HPLC分析に供した.また,遠心後に得た細胞残渣を 300µLの0.1N水酸化ナトリウムで溶解した.水酸化ナ トリウム溶液中のタンパク質濃度は,Bio-Radプロテイ ンアッセイキット(Bio-Rad)を用いたブラッドフォー ド法により決定した(標準物質としてウシ血清アルブミ ンを使用).細胞内ポリアミン濃度はnmol/mg細胞タン パク質で示した.

培養上清中のポリアミンの分析は以下のように行った. 培養上清にトリクロロ酢酸を終濃度10% (w/v)となるように混合した. その後,遠心(18,700×g,4C,15分)を行い,得られた上清をコスモナイスフィルターW(Nacalai Tesque)により濾過し,HPLC分析に供した. 培養上清中のポリアミン濃度は μ Mで示した.

結果および考察

*casdc*は *B. thetaiotaomicron* の増殖とスペルミジン生合 成に寄与している

casdc 遺伝子が B. thetaiotaomicron の増殖にどの程度 寄与しているかを解析する目的で,親株 (Δtdk), casdc 欠損株 ($\Delta tdk \Delta casdc$) および casdc 相補株 ($\Delta tdk \Delta casdc$ att1:casdc⁺) をポリアミンフリー培地にて培養し,生育 度を比較した.この結果,親株 (Δtdk) および casdc 相 補株 ($\Delta tdk \Delta casdc$ att1:casdc⁺) と比較して, casdc 欠損 株 ($\Delta tdk \Delta casdc$ att1:casdc⁺) と比較して, casdc 欠損 株 ($\Delta tdk \Delta casdc$) において生育の遅延が観察された (Fig.2A).同様の結果が別の細菌種の casdc 欠損株にお いても観察されてる (Hanfrey et al., 2011).これらの結 果より, casdc は B. thetaiotaomicron の増殖に必須では ないものの重要な役割を果たしていることが示された. casdcは、細胞内でのスペルミジン生合成に必要なカ ルボキシスペルミジンデカルボキシラーゼをコードする と推定されているので(Fig.1)、次に、casdc 欠損株(Δtdk $\Delta casdc$)における細胞内ポリアミン濃度を解析した.親 株(Δtdk)および casdc 相補株($\Delta tdk \Delta casdc att1:casdc^+$) では、唯一のポリアミンとして細胞内スペルミジンが存 在していたのとは対照的に、casdc 欠損株($\Delta tdk \Delta casdc$) では細胞内スペルミジンが殆ど検出されなかった (Fig.2B).以上より、casdc は B. thetaiotaomicron の細 胞内スペルミジンの産生に寄与する遺伝子であることが 示された.

なお、培養上清中には、B. thetaiotaomicronの親株 (Δtdk) ですらスペルミジンが検出されなかったことか ら (data not shown)、少なくとも今回の実験条件では、 この菌種はスペルミジンを細胞外に放出できないことが 示唆された.しかしながら、B. thetaiotaomicron はマウ ス腸内のスペルミジン増加に関与していることが報告さ れているので (Noack et al., 1998; Noack et al., 2000)、 in vitro とは環境が異なる腸内では本菌はスペルミジン を細胞外に放出できるのかもしれない.

*speA*は *B. dorei*の増殖とスペルミジン生合成に寄与して いる

続いて, speA 遺伝子が B. dorei の増殖にどの程度寄与 しているかを解析する目的で,野生型株,親株 (Δtdk), speA 欠損株 (Δtdk ΔspeA) をポリアミン低濃度培地に て培養し,生育度を比較した.この結果,野生型株およ び親株 (Δtdk) と比較して, speA 欠損株 (Δtdk ΔspeA)



Fig. 2. Growth and intracellular spermidine concentration of *B. thetaiotaomicron* strains in the polyamine-free medium. (A) Growth curve of *B. thetaiotaomicron* strains. Parental strain (Δ*tdk*): open triangles; *casdc* mutant (Δ*tdk* Δ*casdc*): black circles; and *casdc*-complemented strain (Δ*tdk* Δ*casdc att1::casdc*⁺): white circles. (B) Intracellular spermidine concentration of *B. thetaiotaomicron* strains. Cells were withdrawn at the indicated times and analyzed by HPLC. The symbols indicate the same strains as Fig.2A. Data are the mean ± standard deviation of biological triplicates. Reproduced with modifications by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Sakanaka *et al.* Amino Acids (Springer Vienna), 48:2443-2451 (2016) (© Springer-Verlag Wien 2016).

はポリアミン低濃度培地において生育が大幅に低下する ことが明らかとなった(Fig.3A).この結果は, *speA*を 含むポリアミン生合成系遺伝子の欠損が様々な細菌種に おいて増殖の遅延をもたらすという過去の報告と一致す る(Patel *et al.*, 2006; Hanfrey *et al.*, 2011).

speAは、細胞内でのスペルミジン生合成に必要なア ルギニンデカルボキシラーゼをコードすると推定されて いるので、次に、speA 欠損株(Δtdk ΔspeA)における 細胞内ポリアミン濃度を調べた。野生型株および親株 (Δtdk) では、細胞内に唯一のポリアミンとしてスペル ミジンが存在していたのとは対照的に、speA 欠損株 (Δtdk ΔspeA) では細胞内スペルミジンが殆ど検出され なかった(Fig.3B). 低濃度のスペルミジンが観察され たのは、培地由来のスペルミジンを speA 欠損株(Δtdk ΔspeA)が細胞内に取り込んだためであると推察される. 以上より、speA が B. doreiのスペルミジン生合成経路に 関与する主な遺伝子であることが示された.

最近,我々は, B. dorei が細胞内で生合成したスペル ミジンを菌体外に放出することを in vitro の実験におい て報告している (Sugiyama et al., 2017). この特徴は, ヒト腸内常在菌叢最優勢種の限られた種のみで観察され (Sugiyama et al., 2017),宿主の腸におけるスペルミジ ン濃度の増加に寄与している可能性がある.今回の研究 においても培養上清中のスペルミジンの濃度は, B. dorei 野生型株および親株 (Δtdk)では培養時間と共に 増加したが, speA 欠損株 (Δtdk ΔspeA) においてはス ペルミジンが観察されなかった(Fig.3C). この結果は, 細胞外環境におけるスペルミジン濃度の上昇には, *speA* を介した細胞内でのスペルミジン生合成が必須であるこ とを示唆している. *B. dorei*のスペルミジン生合成・輸 送がどの程度腸内ポリアミン濃度に影響を及ぼしている のかについて, 今後マウスモデル等を用いた研究で解明 する必要がある.

ヒトの腸管には数百種類の腸内細菌が生息しており, 様々な代謝産物を産生している(Matsumoto et al., 2012). ポリアミンは,腸内細菌によって産生される主 要な代謝産物の1つであり,それらは宿主の健康に大き な影響を及ぼすと考えられている(Upp et al., 1988; Matsumoto et al., 2011; Kibe et al., 2014). これまでのと ころ,ヒト腸内常在菌叢最優勢種のポリアミン生合成の 分子機構は殆ど明らかとなっていない.本研究では,我々 はヒト腸内常在菌叢最優勢種である Bacteroides 属細菌 において,ポリアミン生合成系遺伝子がスペルミジン生 合成に重要であることを明らかにした. Bacteroides 属細 菌(特に B. dorei)の細胞外環境へのスペルミジン放出 に関しては知見がまだ十分ではないものの,今回我々が得 た成果は腸内ポリアミンがどのように腸内細菌によって制 御されているかを理解するうえで重要であると考えられる.

要 約

腸内に存在するポリアミンは、数百種類の腸内細菌が



Fig. 3. Growth and spermidine concentration of *B. dorei* strains in the polyamine-reduced medium. (A) Growth curve of *B. dorei* strains. Wild-type strain: shaded squares; parental strain (Δ*tdk*): white circles; *speA* mutant (Δ*tdk* Δ*speA*): black circles. (B) Intracellular spermidine concentration of *B. dorei* strains. Cells were withdrawn after being cultured for 24h (Fig. 3A) and were analyzed by HPLC. (C) Spermidine concentration in the culture supernatant. The culture supernatant was withdrawn at the indicated times and analyzed by HPLC. The symbols indicate the same strains as Fig. 3A. Data are the mean ± standard deviation of biological triplicates. Reproduced by permission of Oxford University Press: Sakanaka *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 365:fny003 (2018). (© FEMS 2018)

産生したものであり、宿主の健康に密接に関与している と考えられている.しかし、ヒト腸内細菌のポリアミン 生合成の分子機構は十分に解明されていない.本研究で は、遺伝子破壊ツールを用いて、ヒト腸内で優勢な Bacteroides 属細菌のポリアミン生合成系遺伝子の機能を 解析した.Bacteroides thetaiotaomicronのカルボキシス ペルミジンデカルボキシラーゼ遺伝子 casdc を欠損する と、細胞内のスペルミジンが殆ど検出されなくなった. アルギニンデカルボキシラーゼ遺伝子 speA の欠損は、 Bacteroides doreiの細胞内および培養上清中のスペルミ ジンの濃度の減少をもたらした.また、これらの2つの 遺伝子欠損株では、ポリアミンが全くないまたは少ない 培養条件において生育能が低下していた.以上より、casdc および speA は Bacteroides 属細菌のスペルミジン生合成 に寄与する主要な遺伝子であることが明らかとなった.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 阪中幹祥,杉山友太,北方彩,片山高嶺,栗原新.
 2015. ヒト腸内優占種Bacteroides thetaiotaomicronのスペルミジン合成はcarboxyspermidine decarboxylaseによって 制御されている.第8回北陸合同バイオシンポジウム 2015. 10月30-31日.石川.
- 阪中幹祥,杉山友太,北方彩,片山高嶺,栗原新.
 2015. ヒト腸内細菌Bacteroides thetaiotaomicronの carboxyspermidine decarboxylaseはスペルミジン合成に寄 与している.日本ポリアミン学会第7回年会.11月13-14 日.京都.
- 阪中幹祥,杉山友太,北方彩,片山高嶺,栗原新.
 2016. ヒト腸内細菌Bacteroides thetaiotaomicronのスペル ミジン生合成に関与するカルボキシスペルミジン脱炭酸 酵素.日本農芸化学会2016年度大会.3月27-30日.札幌.
- 4)阪中幹祥,杉山友太,奈良未沙希,北方彩,栗原新. 2018.マーカーレス遺伝子欠損を利用したヒト腸内細菌 Bacteroides doreiのアルギニンデカルボキシラーゼ遺伝子の機能解析.日本ポリアミン学会第9回年会.1月19-20日.兵庫.
- 5) 阪中幹祥,杉山友太,奈良未沙希,北方彩,栗原新. 2018. ヒト腸内常在菌叢最優勢種Bacteroides doreiにおけ るマーカーレス遺伝子欠損系の確立およびポリアミン代 謝系遺伝子の機能解析.日本農芸化学会2018年度大会.3 月24-27日.名古屋.
- 6)阪中幹祥,杉山友太,奈良未沙希,北方彩,栗原新. 2018.ヒト腸内常在菌叢優勢種 Bacteroides doreiのポリア ミン放出能とアルギニンデカルボキシラーゼ遺伝子の機 能解析.第22回腸内細菌学会.5月31日-6月1日.東京.
- 原著論文
 - Sakanaka, M., Sugiyama, Y., Kitakata, A., Katayama, T. & Kurihara, S. 2016. Carboxyspermidine decarboxylase of the prominent intestinal microbiota species *Bacteroides thetaiotaomicron* is required for spermidine biosynthesis and contributes to normal growth. Amino Acids 48: 2443-2451.

2) Sakanaka, M., Sugiyama, Y., Nara, M., Kitakata, A. & Kurihara. S. 2018. Functional analysis of arginine decarboxylase gene *speA* of *Bacteroides dorei* by markerless gene deletion. FEMS Microbiol. Lett. **365**: fny003.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所寄附講座助成により 行われたものです.この場を借りて厚く御礼申し上げま す.本研究の一部は公益財団法人旭硝子財団(栗原新) による研究助成により行われました.ここに深く感謝致 します.また, *Bacteroides* 属細菌の遺伝子操作ツールを 譲渡頂いた Thomas J. Smith博士(Donald Danforth Plant Science Center, USA)および Nicole Koropatkin博 士(University of Michigan Medical School, USA)に心 より感謝致します.

文 献

- Hanfrey, C.C., Pearson, B.M., Hazeldine, S., Lee, J., Gaskin, D.J., Woster, P.M., Phillips, M.A. & Michael, A.J. 2011. Alternative spermidine biosynthetic route is critical for growth of *Campylobacter jejuni* and is the dominant polyamine pathway in human gut microbiota. J Biol Chem 286: 43301-43312.
- Kibe, R., Kurihara, S., Sakai, Y., Suzuki, H., Ooga, T., Sawaki, E., Muramatsu, K., Nakamura, A., Yamashita, A., Kitada, Y., Kakeyama, M., Benno, Y. & Matsumoto, M. 2014. Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. Sci Rep 4: 4548.
- Koropatkin, N.M., Martens, E.C., Gordon, J.I. & Smith, T.J. 2008. Starch catabolism by a prominent human gut symbiont is directed by the recognition of amylose helices. Structure 16: 1105-1115.
- Matsumoto, M., Kurihara, S., Kibe, R., Ashida, H. & Benno, Y. 2011. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. PLoS One **6**: e23652.
- Matsumoto, M., Kibe, R., Ooga, T., Aiba, Y., Kurihara, S., Sawaki, E., Koga, Y. & Benno, Y. 2012. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. Sci Rep 2: 233.
- Michael, A.J. 2015. Biosynthesis of polyamines in eukaryotes, archaea, and bacteria. *In* Kusano, T. & Suzuki, H., (eds.), Polyamines: A Universal Molecular Nexus for Growth, Survival, and Specialized Metabolism, p. 3-14. Springer, Tokyo.
- Noack, J., Dongowski, G., Hartmann, L. & Blaut, M. 2000. The human gut bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Fusobacterium varium* produce putrescine and spermidine in cecum of pectin-fed gnotobiotic rats. J Nutr 130: 1225-1231.
- Noack, J., Kleessen, B., Proll, J., Dongowski, G. & Blaut, M. 1998. Dietary guar gum and pectin stimulate intestinal microbial polyamine synthesis in rats. J Nutr **128**: 1385-1391.
- Patel, C.N., Wortham, B.W., Lines, J.L., Fetherston, J.D., Perry, R.D. & Oliveira, M.A. 2006. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. J Bacteriol 188: 2355-2363.

- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S.D. & Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 464: 59-65.
- Sakanaka, M., Sugiyama, Y., Kitakata, A., Katayama, T. & Kurihara, S. 2016. Carboxyspermidine decarboxylase of the prominent intestinal microbiota species *Bacteroides thetaiotaomicron* is required for spermidine biosynthesis and contributes to normal growth. Amino Acids 48: 2443-2451.
- Sakanaka, M., Sugiyama, Y., Nara, M., Kitakata, A. & Kurihara, S. 2018. Functional analysis of arginine decarboxylase gene speA

of *Bacteroides dorei* by markerless gene deletion. FEMS Microbiol Lett **365**: fny003.

- Sugiyama, Y., Nara, M., Sakanaka, M., Gotoh, A., Kitakata, A., Okuda, S. & Kurihara, S. 2017. Comprehensive analysis of polyamine transport and biosynthesis in the dominant human gut bacteria: Potential presence of novel polyamine metabolism and transport genes. Int J Biochem Cell Biol 93: 52-61.
- Tabor, C.W. & Tabor, H. 1985. Polyamines in microorganisms. Microbiol Rev 49: 81-99.
- Upp, J.R., Jr., Saydjari, R., Townsend, C.M., Jr., Singh, P., Barranco, S.C. & Thompson, J.C. 1988. Polyamine levels and gastrin receptors in colon cancers. Ann Surg 207: 662-669.
- Wexler, A.G., Bao, Y., Whitney, J.C., Bobay, L.M., Xavier, J.B., Schofield, W.B., Barry, N.A., Russell, A.B., Tran, B.Q., Goo, Y.A., Goodlett, D.R., Ochman, H., Mougous, J.D. & Goodman, A.L. 2016. Human symbionts inject and neutralize antibacterial toxins to persist in the gut. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113: 3639-3644.

複数の腸内常在細菌の生存戦略が組み合わさることによって成立する 新規ハイブリッドシステムによる生理活性物質ポリアミンの生産

栗 原 新

石川県立大学生物資源環境学部寄付講座腸内細菌共生機構学 〒921-8836 石川県野々市市末松1-308

Bioactive polyamine production by a novel hybrid system comprising multiple indigenous gut bacterial strategies. Shin Kurihara

Host-Microbe Interaction Research Laboratory Faculty of Bioresources and Environmental Sciences Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

We have previously shown that the level of putrescine, a polyamine found abundantly in the human intestinal lumen, in the colonic lumen putrescine was increased following administration of arginine and the probiotic *Bifidobacterium* sp.; however, the underlying mechanism remained poorly understood. Here, we report a novel pathway for putrescine production from arginine through agmatine by collaboration of two bacterial groups, which was triggered by environmental acidification (drop in pH to below 6.5 from neutral). This pathway comprises the acid-tolerance system of *Escherichia coli*, representing bacteria possessing an arginine-dependent acid resistance system; the energy production system of *Enterococcus faecalis*, representing bacteria possessing an agmatine deiminase system; and the acid production system of the acid-producing bacteria, represented by *Bifidobacterium* spp. This pathway is unique because it represents a relationship between the independent survival strategies of multiple bacteria.

Key words: metabolites, polyamines, transporter, biosynthesis, hybrid biosynthetic pathway, *Bifidobacterium* sp., *Escherichia coli, Enterococcus faecalis*

緒 言

腸内細菌に由来する様々な代謝産物は宿主の健康状態 および疾病の発症に関連しており(Sharon *et al.*, 2014), プロバイオティクス細菌はこれら代謝産物の生産に影響 を与えることによって,腸内微細菌叢の代謝産物組成を 最適化すると予想される.

栗原 新 (skurihara@waka.kindai.ac.jp)(現所属:近畿大学生物理工学部〒649-6433和歌山県紀の川市西三谷930)
共同研究者
北田雄祐 (協同乳業株式会社),
村松幸治 (協同乳業株式会社),
東樹宏和 (京都大学生態学研究センター),
木邊量子 (日本獣医生命科学大学獣医学部),
辨野義己 (国立研究開発法人理化学研究所),
松本光晴(協同乳業株式会社)

ポリアミン(主なものにプトレッシンおよびスペルミ ジンがある)は腸内細菌の重要な代謝産物であり、プト レッシンは健康なヒトにおいて腸管内腔に0.5-1mM 程度の濃度で存在する (Matsumoto & Benno, 2007; Matsumoto et al., 2007). これらの有機カチオンはほと んど全ての生物に見出だされ (Pegg, 1986; Tabor & Tabor, 1985), 細胞の適切な成長と増殖に必要である. ポリアミンは、オートファジーの誘導 (Eisenberg et al., 2009)、炎症の抑制 (Soda et al., 2009)、認知機能の改善 (Gupta et al., 2013), 心不全の進行の抑制 (Eisenberg et al., 2016) を通じて動物の健康を促進することがこれま でに報告されている.一方で,腫瘍では高濃度のポリア ミンが観察され (Gerner & Meyskens, 2004), ポリアミ ン合成における重要な酵素であるオルニチンデカルボキシ ラーゼを選択的に阻害した場合に、結腸癌を含む悪性腫 瘍が抑制されることが明らかとなっており、現在臨床研究

E-mail:

新

が進められている (Gerner & Meyskens, 2004; Laukaitis & Gerner, 2011). このように,腸管腔内のポリアミンが健 康に有益であるか有害であるかについては議論の余地が あるが,腸管内でのそれらの濃度を調節し最適化するた めの技術開発は,少なくとも実用的な価値を有する.

我々の研究グループでは、ポリアミンの生合成が損な われた高齢者において、体内のポリアミンレベルを増加 させる目的で、腸内細菌由来のプトレッシンの生産を促 進する新しい食品や技術を創り出すことを最終目的とし て、ポリアミンと抗加齢との関連を研究してきた.一方 で、結腸中のポリアミンレベルを減少させる必要がある 結腸癌の患者に対しても、大腸腸管内腔におけるポリア ミン産生のメカニズムの解明は、有用であると考えられる.

食物由来のポリアミンは消化管下部に達する前に主に小 腸で吸収されるため(Uda et al., 2003),大腸腸管内腔の ポリアミンの大部分は腸内常在菌叢によって生産される (Matsumoto et al., 2012).したがって,高齢者に代表され る腸管腔内ポリアミンのレベルが低いヒトの腸管内腔にお いて,健康な個人の正常レベルである 0.5-1mM のポリア ミン濃度を維持するためには,微生物のポリアミン代謝お よび輸送の調節が必要である(Matsumoto et al., 2007). これまでの研究で,アルギニンとプロバイオティクスを同時 投与した場合に大腸腸管内腔のポリアミン濃度が増加する ことがわかっているが,そのメカニズムは遺伝子レベルで はほとんど解明されておらず(Kibe et al., 2014; Matsumoto et al., 2011),このことは、遺伝子発現の調節を通じた腸 管腔内のポリアミン濃度の最適化を困難なものとしている.

プトレッシンは、アルギニンデカルボキシラーゼ (SpeA およびAdiA)によるアルギニンの脱炭酸によって産生され るアグマチンを原料として、細菌細胞内で腸内細菌により 生合成される. このアグマチンをプトレッシンへと変換する 代謝経路としては、これまでに2つが報告されている。1 つ目の経路はアグマチンが直接プトレッシンに変換されるア グマチンウレヒドロラーゼ (SpeB) 経路である. 2つ目の 経路は、N-カルバモイルプトレッシン経路であり、この経路 ではアグマチンを基質として、アグマチンイミノヒドロラーゼ (AIH) に触媒される反応によって生成した N-カルバモイル プトレッシンが、N-カルバモイルプトレッシンアミドヒドロ ラーゼ (NCPAH) に触媒される反応によりプトレッシンへ と変換される. ヒト腸内常在菌叢における最優勢56菌種 (Qin et al., 2010)の in silico ゲノム分析の結果, 多くの腸 内常在菌叢最優勢種は不完全なプトレッシンの合成経路し か有さないために、多くの細菌種が単独ではアルギニンか らプトレッシンを生産することができないことが予測された (Burrell et al., 2010; Sugiyama et al., 2017). このことは、 腸内の複数の細菌種で構成される代謝経路の存在を示唆 するが、これまでに、そのような"ハイブリッド代謝経路"

を遺伝子レベルで解明した研究は存在しなかった.また, 微生物が特定の代謝産物の合成経路を有していることが そのゲノム配列から推測されたとしても,必ずしもその代 謝産物を放出するわけではないために,特定の細菌から目 的の代謝産物の放出を確認するためには,合成経路およ び標的代謝産物のトランスポーターの双方に関連する遺伝 子発現を分析することが必要である.しかしながら,メタ ゲノム解析およびメタトランスクリプトーム解析を用いて, 特定の代謝産物に対する合成経路を構成する遺伝子の発 現と,同じ代謝産物に対するトランスポーターの発現との 間の関連を同定することは非常に困難である.そこで,本 研究では,伝統的な培養と分子生物学的手法を用いて, 単一の細菌種による代謝産物の合成と放出の経路とは異 なる,様々な細菌種が関与する目的の代謝産物を合成・放 出する新規なハイブリッド経路の解明を行った.

プロバイオティクスは、発酵食品などに含まれ、体内 で有益な働きをする善玉菌およびこれが含まれる食品で あり、ビフィズス菌がその代表例として知られている (Rijkers et al., 2010). プロバイオティクスの機能の一つ として、腸内細菌叢由来の代謝産物の組成に影響を与え ることによる腸内環境の改善を通じた、宿主の健康増進 への寄与が挙げられる(Fuller, 1989). これまで我々は、 マウスへの Bifidobacterium animalis subsp. lactis の経口 投与が結腸ポリアミン濃度を増加させることを報告して いる(Matsumoto et al., 2011). Bifidobacterium 属細菌は ポリアミン生合成に関与する酵素のホモログを持たな い. したがって、ビフィズス菌投与によるマウスの大腸 腸管内腔のポリアミン濃度の増加は、腸内常在菌叢によ るポリアミン生合成の活性化に起因する可能性が高い.

本研究では、伝統的な培養、分子生物学的手法、およ び共生細菌代謝経路の組み合わせを用いて、アルギニン を起点としアグマチンを反応中間体とした2つの細菌 (大腸菌および Enterococcus faecalis) にまたがる新規の ハイブリッド・プトレッシン生産経路を遺伝子レベルで 同定した.この大腸菌および En. faecalisの共存によっ て生合成されるプトレッシンは、Bifidobacterium 属細菌 等の酸を産生する細菌によって形成される酸性環境にお ける、大腸菌による耐酸性機構および En. faecalis による エネルギー獲得機構という、それぞれの細菌による独立 した生存戦略の組み合わせの結果生じる副産物であった.

実験方法

細菌株およびプラスミド

この研究で用いたヒトの腸内細菌叢における主要な 14 菌種の腸内細菌 (Qin *et al.*, 2010) を含む菌株, プラス ミド, およびプライマーを Table 1 に示した.

Strain, plasmid, or	Characteristic or sequence	Source or reference			
oligonucleotide					
Strains					
Alistipes putredinis JCM 16772	JCM				
Bacteroides vulgatus JCM 582	JCM				
Bacteroides caccae JCM 9498	Т	JCM			
Bacteroides thetaiotaomicron J	СМ 5827 ^т	JCM			
Bacteroides uniformis JCM 58	28 ^T	JCM			
Bifidobacterium adolescentis J	CM 1275 ^T	JCM			
Bifidobacterium longum JCM	1217 ^T	JCM			
Blautia hansenii JCM 14655 ^T		JCM			
Clostridium leptum DSM 753 ^T		DSMZ			
Enterococcus faecalis JCM 580	JCM				
Escherichia coli JCM 5491	JCM				
Parabacteroides johnsonii JCN	1 13406 ^T	JCM			
Parabacteroides merdae JCM	9497 ^T	JCM			
Streptococcus thermophilus NF	BRC 13957	NBRC			
Escherichia coli K-12					
JW4076	ME9062 except ΔadiC:: FRT-kan ⁺ -FRT	(Baba et al., 2006)			
JW5731	ME9062 except Δ <i>adiA</i> :: FRT- <i>kan</i> ⁺ -FRT	(Baba <i>et al.</i> , 2006)			
LKM10096	pBeloBAC11/MG1655	This study			
LKM10097	pBelobac11/SK903	This study			
		Continued on the next page.			

Table 1. Strains, plasmids, and oligonucleotides used in this study

栗	原	新

Table 1 continued

	Continued.		
LKM10100	pBelobac11-adiC ⁺ /SK903	This study	
ME00/2	$rrnB \Delta lacZ4787 hsdR514 \Delta (araBAD)567$	(D-1- (1 2000)	
ME9002	$\Delta(rhaBAD)$ 568 rph-1	(Baba <i>et al.,</i> 2006)	
MG1655	F ⁻ prototrophic	C. A. Gross	
SK900	MG1655 except ∆adiA:: FRT-kan ⁺ -FRT	This study	
SK901	MG1655 except ∆ <i>adiA</i> ::FRT	This study	
SK902	MG1655 except ∆adiC:: FRT-kan ⁺ -FRT	This study	
SK903	MG1655 except ∆ <i>adiC</i> ::FRT	This study	
SK912	pBelobac11-adiA ⁺ /SK901	This study	
SK914	pBelobac11/SK901	This study	
SK930	pBelobac11/MG1655 except ∆ <i>speB</i> ::FRT	This study	
5K930	ΔspeC::FRT ΔspeF::FRT	This study	

Enterococcus faecalis

SK932	pLT06- <i>\DeltaguD</i> /V583	This study
SK934	V583 except $\triangle aguD \ lacZ^+ \ cat^+ \ pheS^+ \ aguD^+$	This study
SK937	V583 except ∆aguD	This study
SK947	pLZ12/V583	This study
SK948	pLZ12/SK937	This study
SK949	pLZ12-aguB ⁺ D ⁺ /SK937	This study

Continued on the next page.

		Continued.			
V583	Clinical isolate, TIGR sequence strain; Van ^R	ATCC 700802			
Plasmids					
harbouring genes of <i>E. coli</i> K-1	2 MG1655				
pBelobac11	Mini-F replicon <i>cat</i> ⁺	New England Biolabs			
pBelobac11-adiA ⁺	Mini-F replicon <i>cat</i> ⁺ <i>adiA</i> ⁺	This study			
pBelobac11-adiC ⁺	Mini-F replicon $cat^+ adiC^+$	This study			
harbouring genes of En. faecali	is V583				
pLT06	<i>repA</i> -ts replicon <i>pheS</i> ⁺ - <i>cat</i> ⁺ - <i>lacZ</i> ⁺	(Thurlow <i>et al.</i> , 2009)			
pLT06-ΔaguD	<i>repA</i> -ts replicon $\Delta aguD$ pheS ⁺ cat ⁺ lacZ ⁺	This study			
pLZ12	pSH71 replicon <i>cat</i> ⁺	(Perez-Casal et al., 1991)			
pLZ12-aguB ⁺ D ⁺	pSH71 replicon $cat^+ aguB^+D^+$	This study			
Oligonucleotides					
adiA_300bp-up_for	ccgtgccggcacgttTCAAGTAGTCGTTTTTACAC	3			
adiA_term_rev	ggatgcagcccggttTTACGCTTTCACGCACATAA	Α			
adiC_300bp-up_for	ccgtgccggcacgttAAAAGTTGAAAAGCGAAAAC				
adiC_term_rev	ggatgcagcccggttTTAATCTTTGCTTATTGGTG				
		Continued on the next page.			

 Table 1
 continued

栗 原 新

Table 1 continued

Continued.

Clone_agcB+0.5K_FWD	tgaattcattaggatcGTGCGGTCATAAAGGTCTGA
Clone_agcD+COMPL	aggaagatetggateTTAGCCATTTTCTTTCGTTCCCTT

ポリアミン生産菌のスクリーニング

14種類の腸内細菌のうち,L-アルギニンからプトレッシンを生成する腸内細菌種の2菌種を組み合わせ,91 通りについて共培養し、その培養上清中のプトレッシン 濃度を測定した.

大腸菌と En. faecalis の共培養

大腸菌と*En. faecalis*を2mMのL-アルギニンを含有 するLB培地中を用いて37℃で24時間,嫌気性条件下 で共培養,あるいは単独で培養した.その後,培養上清 中のプトレッシン濃度をHPLCを用いて測定した.

大腸菌または En. faecalis 由来の培養上清を用いた培養

大腸菌または En. faecalis の 24 時間培養後の培養液を 回収し遠心によって培養上清を得た後に、フィルター滅 菌した.次いで、もう一方の株を滅菌培養上清中で24 時間培養し、最終培養上清中のL-アルギニン、アグマチ ン、およびプトレッシン濃度を測定した.

大腸菌, En. faecalis, Citrobacter youngae, Fusobacterium varium および Bifidobacterium 属細菌の単独培養

野生型大腸菌(MG1655)は嫌気性条件下でpH4.0-9.0 に調整した培地で培養した.野生型*En. faecalis* (V583)は5mMアグマチンを含み,pH4.0-9.0に調整 した培地,または0-3g/Lグルコースおよび5mMアグ マチンを含みpH6.0に調整した培地で培養した.*C. youngae* ATCC 29220および*F. varium* ATCC 27725を嫌 気性条件下でpH4.0-9.0に調整した培地で培養した. *Bifidobacterium* 属細菌は,嫌気性条件下でpH6.5に調整 した培地で培養した.

大腸菌, En. faecalis, ビフィズス菌の3菌種を用いた共 培養

大腸菌のプトレッシン合成酵素遺伝子破壊株(SK930, プトレッシン欠損株)と*En. faecalis*の野生型株(V583) の2菌種の共培養,あるいは大腸菌のプトレッシン合成 酵素遺伝子破壊株(SK930),*En. faecalis*の野生型株 (V583),ビフィズス菌の2菌種の共培養を行い,培養 上清中のプトレッシン濃度およびpHを測定した.

ノトバイオートマウスの作成

6週齢の無菌マウスに、大腸菌のプトレッシン合成酵素 遺伝子 破壊株 (SK930), En. faecalis の 野生 型株 (V583), En. faecalis の aguD 遺伝子 破壊株 (SK948), En. faecalis の aguD 遺伝子相補株 (SK949), B. animalis subsp. lactis (LKM512), F. varium (ATCC 27725) を それぞれ単独あるいは複数菌種定着させたノトバイオートマウスを作成した.

さまざまな pH での人間の糞便の培養

6人のボランティアからいただいた糞便を,9倍量(w/v) の100mM MES 緩 衝 液 (pH4.2, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, お よび7.0) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) に懸濁した. 懸濁液を嫌気性条件下で24時間インキュ ベートし,培養上清中のポリアミン濃度を測定した.

ポリアミン, L-アルギニン,およびアグマチン濃度の測定

培養上清中のポリアミン, L-アルギニンおよびアグマ チン濃度は, FLR検出器を装備した HPLC (Acquity, Waters, Milford, MA, USA) を用いて以前の方法に従い 定量した (Kibe *et al.*, 2014).

Blast を使用したインシリコ経路解析

プロテイン BLAST (Blastp) (Camacho *et al.*, 2009) 分析は、ヒト腸内常在菌 126 細菌株のタンパク質配列 データを用いて行った (Yatsunenko *et al.*, 2012).

F. varium と C. youngae の共培養

大腸菌と*En. faecalis*の共培養と同様に, *F. varium* と*C. youngae* を共培養し、培養上清中のプトレッシン濃度を 決定した.

統計分析

細胞外および糞便中のプトレッシン濃度, pH, およ び生菌数を, スチューデントのt検定, 一元配置分散分 析 (Tukey's test に基づく), Steel-Dwass 検定, または Wilcoxon の符号付き順位検定を用いて試験を行ったグ ループ間で比較した. 0週目と12週目の比較は, 対応 のある t 検定または Wilcoxon の符号付き順位検定を使 用して検定した. スチューデントの t 検定および一元配 置分散分析 (Tukey's test に基づく) は, SPSS ver.22 (IBM, Armonk, NY)を用いて行い, 他の分析は R統 計ソフトウェア ver.3.4.2 または SPSS ver.22 を用いて 行った.

結 果

細菌の共培養によるプトレッシン生産の誘導

まず、腸内細菌を単一菌株で培養した場合と複数菌株 を共培養した場合の培養上清中のプトレッシン濃度を比 較した. アルギニンを含む培地中のヒト腸内の4つの主 要な門に含まれる14種を同時に共培養した培養上清中 のプトレッシン濃度は8.5mMであり、これら14種を単 独で培養した場合の濃度(0-1.02mMの範囲であり. 平均濃度は 0.21 mM) の 10 倍以上高かった. (Fig. 1A). プトレッシンの高生産を誘導した菌種の組み合わせを決 定する目的で、共培養した14菌種から様々な2菌種を 組み合わせ、培養上清中のプトレッシン濃度を定量した. この結果,大腸菌とEn. faecalisを共培養した場合に 8.0mMのプトレッシンが培養上清中に蓄積し、これは 試験を行った全ての組み合わせのうちで最高の濃度で あった (Fig.1B). この濃度は、大腸菌と En. faecalis を 個別に培養した場合に観察された濃度よりも8倍以上高 かった.大腸菌とEn. faecalisの共培養でのプトレッシ ン生産は培地のpHが5.5のときに最も高かった.これ はプトレッシン生産の誘導が、バクテリアの酸耐性シス テムによるものであることを示唆している. 大腸菌はア ルギニンを吸収し、アグマチンに変換し、このアグマチ ンを細胞外へと放出する機構を有しており、この際に細 胞内のH+が消費されるために、この機構は、アグマチ ンを利用した耐酸性システムとして知られている (Suárez et al., 2013). 一方で En. faecalis は細胞外のア グマチンを利用してATPを産生する経路を持っており、 この経路の副産物として細胞外にプトレッシンが放出さ れ、さらに細胞内でH⁺が消費される(Suárez *et al.*、 2013). 重要なことは、アグマチンがアルギニンからプ トレッシンを生産する際の反応中間体であることである.

大腸菌または En. faecalis が他の細菌によって放出さ れた細胞外のアグマチンを利用してアルギニンからプト レッシンを合成する可能性を評価するために,一方の細 菌の培養上清を用いて他方を培養し,最終的な培養上清 のアルギニン,プトレッシンおよびアグマチン濃度を定 量した.大腸菌を培地で培養した際の各物質の濃度変化 はアルギニンで2.51から0.64mM(初期濃度の26%) への減少,アグマチンで0.35から2.51mMへの増加, プトレッシンで0から0.71mMへの増加であった (Fig.1C, 0-24h). この大腸菌の培養上清を用いてEn. faecalis を培養した際の各物質の濃度変化は、アグマチ ンで2.51から0.10mM(初期濃度の3.9%)への減少。 プトレッシンで0.71から3.21mMへの増加であった (Fig.1C, 24-48h). 対照的に, En. faecalisの培養上清 を用いて大腸菌を培養した場合は、最終的な培養上清中 にはアグマチン、プトレッシンの双方が産生されず、ア ルギニンはほとんど存在しなかった(Fig.1D).以上の 結果を統合すると、大腸菌と En. faecalis の共培養時に 観察されたアルギニンを原料としたプトレッシン生産の 誘導は、大腸菌から En. faecalis ヘアグマチン (アルギ ニンとプトレッシンの間の反応中間体である)が受け渡 された結果起こったと示唆された.

大腸菌と En. faecalis による連続的な物質変換によるプ トレッシン生産

大腸菌はアルギニンデカルボキシラーゼ(AdiA)とア ルギニン-アグマチンアンチポーター (AdiC) からなる 耐酸性システムを有する (Foster, 2004). En. faecalis に おいては、アグマチンデイミナーゼ (AguA) とアグマ チン-プトレッシンアンチポーター (AguD) に同様の 酸耐性システムが存在する(しかし、このシステムは酸 で誘導されないことがこれまでに報告されている (Suárez et al., 2013). 我々は、別個の細菌に由来するこ れら2つの耐酸性システムが組み合わさって、誘導され たプトレッシン生産をもたらすという仮説を立てた.こ の仮想経路(Fig.2)では、アルギニンはAdiCによっ て培地から大腸菌細胞に取り込まれ, AdiA/SpeA によっ てアグマチンに変換される. 生成したアグマチンは、そ の後,大腸菌細胞からAdiC を介して培地中に放出され る.次に, En. faecalis は AguD により培地からアグマチ ンを吸収する. En. faecalisの細胞内で、アグマチンは AguA とプトレッシンカルバモイルトランスフェラーゼ (AguB) による連続的な反応によってプトレッシンに 変換される. 生成したプトレッシンは, AguD を介して En. faecalis 細胞から培地中へ放出される. これら2つの 細菌の代謝および輸送経路の組み合わせにより、プト レッシンの生産が促進された可能性が考えられた.

この仮説を実証するために, *adiA* 遺伝子を破壊あるい は相補した大腸菌を作成し,野生型の*En. faecalis*と共培 養した(Fig.3A). まず, 2mM L-アルギニン, 1.5g/L D-グルコース, および 0.5g/L L-システイン-塩酸塩を含 む LB 培地(LB-RGC)で,野生型大腸菌(LKM10096)





В

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. Alistipes putredinis														
2. Bacteroides caccae	0.2							Putrescine concentration (mM)				M)		
3. Bacteroides thetaiotaomicron	0.1	N.D.							unos		00000	man	511 (III	NI)
4. Bacteroides uniformis	1.2	0.1	0.0					1	ow				Hi	ah
5. Bacteroides vulgatus	0.2	N.D.	0.2	0.1				_	011					9
6. Parabacteroides johonsonii	N.D.	N.D.	N.D.	0.5	0.2									
7. Parabacteroides merdae	0.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.								
8. Blautia hansenii	0.0	0.2	N.D.	N.D.	0.5	N.D.	N.D.							
9. Enterococcus faecalis	N.D.	0.2	0.2	0.8	0.8	0.3	0.8	0.1						
10. Clostridium leptum	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.2	N.D.	N.D.	0.2	0.0					
11. Streptococcus thermophilus	0.4	N.D.	N.D.	0.3	N.D.	N.D.	N.D.	0.2	0.1	0.1				
12. Bifidobacterium adolescentis	N.D.	0.2	N.D.	N.D.	0.1	0.6	0.5	N.D.	0.3	N.D.	N.D.			
13. Bifidobacterium longum	N.D.	N.D.	0.2	N.D.	0.0	0.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		
14. Escherichia coli	0.6	0.8	2.0	1.3	1.6	0.8	1.3	1.1	8.0	0.7	1.5	0.7	0.3	







Figure 2. Hypothetical putrescine production pathway consisting of the acid resistance system of *E. coli* and an ATP synthesis system of *En. faecalis*. A putrescine biosynthesis pathway consisting of sequential reactions accomplished by *E. coli* and *En. faecalis*. Details are shown in the text. Abbreviations: Arg, arginine; Agm, agmatine; Put, putrescine; AdiA, arginine decarboxylase; AdiC, arginine/agmatine antiporter; AguA, agmatine deiminase; AguB, putrescine carbamoyltransferase; AguC, carbamate kinase; AguD, agmatine/putrescine antiporter.

と野生型 *En. faecalis* (SK947) を共培養したところ, その上清中に1.82mMのプトレッシンが生成した.次に, 大腸菌の *adiA* 破壊株 (SK914) と野生型 *En. faecalis* を 共培養した場合, プトレッシン生産はほぼ消失した. さ らに大腸菌の *adiA* 相補株 (SK912) と野生型 *En. faecalis* を共培養したところ, プトレッシン生産は完全に回復し た. 同様に, *adiC* 欠失大腸菌 (LKM10097) を野生型 *En. faecalis* と共培養した場合, プトレッシン生産は消 失し, 大腸菌の *adiC* 相補株 (LKM10100) および野生 型 *En. faecalis* を用いた相補実験ではプトレッシン生産 は完全に回復した (Fig.3B).

さらに我々は, *En. faecalis* における *aguD* の役割を調 べた(Fig.3C). 野生型大腸菌を *En. faecalis* の *aguD* 破 壊株(SK948)と共培養した場合,プトレッシン濃度は 野生型大腸菌と野生型 *En. faecalis* を共培養した場合の 14%(0.26 mM)にまで減少した.一方で野生型大腸菌 を *En. faecalis* の *aguD* 相補株(SK949)を用いた相補実 験では,プトレッシン濃度は0.68 mM(野生型大腸菌と 野生型 *En. faecalis* を共培養した場合のプトレッシン濃 度の37%)に回復した. これらの結果により、培地中のアルギニンが大腸菌お よび En. faecalis の酵素およびトランスポーターからな るハイブリッドシステム(Fig.2)によって、プトレッ シンに変換されることが遺伝学的に証明された.

2種の細菌によるハイブリッド・プトレッシン生産シス テムはマウス腸管においても機能する

プトレッシン生産経路(Fig.2)がマウスの腸管内に おいても機能することを示す目的で、大腸菌およびEn. faecalisが定着したノトバイオートマウスを用いた実験 を行った.野生型大腸菌とaguD欠失En.faecalisを共培 養した場合、プトレッシン生産は完全には消失しなかっ たので(Fig.3C)、プトレッシン欠損大腸菌(SK930, pBelobac11/ΔspeBΔspeCΔspeF;全てのプトレッシン生合 成遺伝子を破壊したために、プトレッシンを合成できな いが、その前駆体であるアグマチンについては合成でき る)を作製し、この実験に使用した.プトレッシン欠損 大腸菌および野生型En.faecalisをLB-RGC 培地中で共 培養した場合,培養上清中のプトレッシン濃度は2.8mM に達した(Fig.3D).対照的に、プトレッシン欠損大腸 栗 原 新



Figure 3. Validation of the hypothesis of sequential reactions in *E. coli* and *En. faecalis* using bacteria whose genes encoding transporters and enzymes were deleted or complemented. (A, B) Extracellular putrescine concentration in cocultures of wild-type *En. faecalis* (SK947) and *E. coli* including gene knockout mutants or complementary transformants of (A) arginine decarboxylase (*adiA*) of *E. coli* or (B) arginine-agmatine antiporter (*adiC*) of *E. coli*. (C) Extracellular putrescine concentrations in cocultures of wild-type *E. coli* (LKM10096) and *En. faecalis* including the wild type, gene knockout mutants, or complementary transformants of agmatine-putrescine antiporter (*aguD*). (D) Extracellular putrescine concentration in cocultures of putrescine-deficient *E. coli* (SK930) and wild-type *En. faecalis* (SK947). Coculture of these bacteria was conducted under anaerobic conditions at 37 ℃ for 24 h in LB-RGC. (E, F) Putrescine concentrations in the content of (E) cecal lumen and (F) colonic lumen of gnotobiotic mice colonized with putrescine-deficient *E. coli* (SK930) and wild-type *En. faecalis* (SK947). Error bars represent SEs. One-way ANOVA with Tukey's test; *p<0.05; **p<0.01.</p>

菌および En. faecalis の aguD 破壊株 (SK948) を共培養 した場合、プトレッシン生産は完全に消失した、プトレッ シン欠損大腸菌と En. faecalis の aguD 相補株 (SK949) の共培養は、プトレッシン欠損大腸菌と野生型En. faecalisの共培養の21%のレベルでプトレッシンが生産 された (Fig.3D). 次に, それぞれの細菌株の共培養ペ アを無菌マウスに投与して得られたノトバイオートマウ スの盲腸および結腸の内容物中のプトレッシン濃度を定 量した.プトレッシン欠損大腸菌および野生型En. faecalis が定着したノトバイオートマウスでは、盲腸に おけるプトレッシン濃度は 100μ Mであった(Fig.3E). 対照的に、プトレッシン欠損大腸菌および En. faecalis のaguD遺伝子破壊株が定着したマウスでは、盲腸にお けるプトレッシン濃度は46µMまで減少した.一方で, プトレッシン欠損大腸菌と En. faecalis の aguD 相補株を 定着させたマウスでは盲腸におけるプトレッシン濃度は ほぼ100%回復した(Fig.3E). 結腸内腔のプトレッシ ン濃度についても同様の傾向を示したが、その差は統計 的に有意ではなかった(*p*=0.079)(Fig.3F). これらの 結果は、大腸菌と En. faecalisの酵素およびトランスポー ターからなるプトレッシンのハイブリッド生産システム が、マウス腸管内においても機能することを示した.

大腸菌と En. faecalis によるハイブリッド・プトレッシン生産システムの生理学的重要性

この研究で観察されたプトレッシン生産の増加は、当 初,大腸菌とEn. faecalisの耐酸性システムの組み合わ せに起因すると考えられた. 大腸菌は. 細胞内のアグマ チンを細胞外のアルギニンと交換するアルギニン依存性 酸耐性系(AR3)を有することが知られている(Richard & Foster, 2004). 野生型の大腸菌 (MG1655) をアルギ ニンを含有する様々なpH(pH5-pH9)の培地中で単 独培養した場合,培養上清のアグマチン濃度は培地の pHが5から9へ上昇すると共に減少した(pH4および 9では細胞増殖が阻害された). これは、大腸菌におけ るアルギニンからのアグマチンの産生が酸耐性システム に依存することを示している. しかしながら, 野生型 *En. faecalis*(V583)をアグマチンを含有する様々なpH (pH5-pH9)の培地中で単独培養した場合は、それぞ れの培地で生産されたプトレッシンの濃度に有意差はな かった (pH4および9では細胞増殖が阻害された).対 照的に,野生型 En. faecalis (SK947) によるプトレッ シン生産はグルコースの存在下で阻害されたことから, この経路がエネルギー産生に関与している可能性が考え られた. これまでに, En. faecalisのプトレッシン産生 経路がエネルギーを得るために活性化されること、酸性 ストレスに対する細菌細胞の保護とは強く関係していな いことが報告されているが (Suárez et al., 2013),本研究 で得られた結果はこれらの結果と一致していた.実際に, 5mM アグマチンを含有する培地中で単独培養された野 生型 En. faecalis (SK947)の生菌数は、同じ培地中で 単独培養された En. faecalis の aguD 破壊株の生菌数も有 意に高かった. さらに、野生型 En. faecalis (SK947) とプトレッシン欠損大腸菌 (SK930)を共培養における En. faecalis の生菌数は、En. faecalis の aguD 遺伝子破壊 株 (SK948)とプトレッシン欠損大腸菌の共培養よりも 有意に高かった. (p<0.05). さらに、En. faecalis の aguD 相補株 (SK949)をプトレッシン欠損大腸菌と共 培養したとき、En. faecalis の生存数は回復した. これ らの結果は、En. faecalis が、アルギニンから大腸菌に より産生されたアグマチンを用いてより有利に増殖する ことを示している.

ビフィズス菌によって生産された酸は En. faecalis と大 腸菌によるハイブリッド・プトレッシン生産システムを 誘導する

本研究において観察されたプトレッシン生産の誘導 は, 培地のpHに強く依存していた (Fig.1D). ビフィ ス菌は乳酸と酢酸を生成し(de Vries & Stouthamer, 1968), 腸管内腔のpHを低下さることが知られている (Bullen et al., 1976). 我々はプトレッシン生産を強く誘 導するビフィズス菌をスクリーニングする目的で、 プト レッシン欠損大腸菌 (SK930) と野生型 En. faecalis (V583)の共培養系にさらに9つのビフィズス菌株をそ れぞれ追加して共培養を行い. それらの培養上清中のプ トレッシンの濃度を比較した (Fig.4A). 試験を行った 組み合わせのうち、プトレッシン欠損大腸菌、野生型 En. faecalis, および B. animalis subsp. lactis LKM512の 3 菌種による共培養における培養上清に最も高濃度のプ トレッシンが検出された. さらに, B. animalis subsp. *lactis*に分類される2株(LKM512とDSM 10140^T)を En. faecalisと大腸菌の共培養系に、それぞれ追加して 培養した際のプトレッシン濃度は大きく異なっていたこ とから、ビフィズス菌のプトレッシン生産誘導能は株に 依存することが示唆された.

次に我々はB. animalis subsp. lactis LKM512 が En. faecalis と大腸菌の共培養でプトレッシン生産を誘導す るメカニズムを調べた. 個別に培養したプトレッシン欠 損大腸菌,野生型 En. faecalis, および B. animalis subsp. lactis LKM512 を 24 時間培養した際の上清の pH は初期 の pH 6.5 からそれぞれ 5.2, 5.3, および 4.4 に減少した が (Fig. 4B), これらの培養上清におけるプトレッシン 濃度は非常に低かった (Fig. 4C). しかしながら, これ ら 3 つの株を共培養した後の培養上清における pH は 5.0 栗 原 新



Figure 4. Effects of acidification by bifidobacteria on putrescine production by *E. coli* and *En. faecalis*. (A) Extracellular putrescine concentration in cocultures of putrescine-deficient *E. coli* (SK930), wild-type *En. faecalis* (V583), and each *Bifidobacterium* sp. (B, C) Extracellular pH (B) and putrescine concentration (C) in cocultures of putrescine-deficient *E. coli* (SK930), wild-type *En. faecalis* (V583), and *B. animalis* subsp. *lactis* LKM512. Coculture of these bacteria was conducted under anaerobic conditions at 37 ℃ for 24 h in LB medium containing 2 mM L-arginine, 1.5g/L D-glucose, 5g/L galactooligosaccharide, 2 mM MgSO₄, 60 mM NH₄Cl, and 0.5g/L L-cysteine-hydrochloride (pH6.5). (D, E) Fecal pH (D) and putrescine concentration (E) in gnotobiotic mice colonized with putrescine-deficient *E. coli* (SK930), wild-type *En. faecalis* (V583), and *B. animalis* subsp. *lactis* LKM512. (F, G) Fecal pH (F) and putrescine (G) concentration in gnotobiotic mice inoculated with putrescine-deficient *E. coli* (SK930), wild-type *En. coli* (SK930), wild-type *En. faecalis* (V583), and *B. animalis* subsp. *lactis* LKM512. (F, G) Fecal pH (F) and putrescine (G) concentration in gnotobiotic mice inoculated with putrescine-deficient *E. coli* (SK930), wild-type *En. faecalis* (V583), and *B. adolescentis* JCM 1275^T. (H) Extracellular putrescine concentration in human feces incubated at different pHs. Error bars represent SEs. One-way ANOVA with Tukey's test, Student's *t*-tests, and Steel-Dwass test; **p*<0.05; ***p*<0.01.</p>

であり、これは B. animalis subsp. lactis LKM512 を追加 せずに共培養した場合のpH5.9よりも有意に低かった (Fig.4B). さらに、3つの株を共培養した場合の培養上 清中のプトレッシン濃度は、LKM512を追加せずに共培 養した場合のプトレッシン濃度の2倍以上であり (p<0.01; Fig.4C), B. animalis subsp. lactis LKM512 lt 大腸菌とEn. faecalisの共培養におけるプトレッシン生 産を促進したと考えられた.しかしながら、細胞外プト レッシン濃度が大腸菌および En. faecalisの両方の生菌 数と正に相関していたので,環境を酸性化させる以外の 因子がこのプロセスに関与している可能性は完全には否 定できなかった. 重要なこととして, 他のビフィズス菌 と比較してより高濃度のプトレッシン生産が観察された B. animalis subsp. lactis LKM512 あるいは B. adolescentis JCM 1275^Tを追加した共培養系においては、大腸菌およ びEn faecalisにおいて、それぞれ3.2×10⁸ cfu/ml以上、7.9 ×10⁷ cfu/ml 以上といった高い生菌濃度を示した. 一方 で、プトレッシン生産に対する誘導能を殆ど有さなかっ た B. longum JCM 1217 あるいは B. pseudocatenulatum JCM 1200を追加して行った共培養においては、大腸菌 および En faecalis の生菌濃度は B. animalis subsp. lactis LKM512 あるいは B. adolescentis JCM 1275^Tを追加した 際の10分の1以下の6.3×10⁶ cfu/ml に留まった. なお. 3 菌種を用いた全ての共培養液において、プトレッシン 生産が最大に達する培養開始12時間以内に、培養上清 のpHは5.5に到達した.

大腸菌および En faecalis を定着させたノトバイオートマ ウスの糞便中のポリアミン生産はビフィズス菌の経口投 与により増強される

動物生体内でのプトレッシン生産において、ビフィズ ス菌によって生成される酸性環境の影響を解析する目的 で、ノトバイオートマウスにプトレッシン欠損大腸菌 (SK930) および野生型 En. faecalis (V583) 2種にさら にビフィズス菌2種(B. animalis subsp. lactis LKM512 あるいは B. adolescentis JCM 1275^T) のうち1種を定着 させたノトバイオートマウスを作成した. 同時にプト レッシン欠損大腸菌および野生型 En. faecalis 2種のみ (ビフィズス菌を定着させない)を定着させたノトバイ オートマウスも作成した. プトレッシン欠損大腸菌およ び野生型 En. faecalis 2種のみを定着させたノトバイオー トマウスと比較して, B. animalis subsp. lactis LKM512 をさらに定着させたマウスの糞便のpHは有意に低く (p<0.01) (Fig. 4D), プトレッシン濃度は有意に高かっ た (p<0.05) (Fig. 4E). しかしながら, プトレッシン 欠損大腸菌および野生型 En. faecalis 2種のみを定着させ たノトバイオートマウスの糞便と, B. adolescentis JCM 1275^Tをさらに定着させたマウスの糞便の pH およびプト レッシン濃度には有意差がなかった (Fig. 4F および 4G). これらの両ビフィズス菌がマウス腸管に定着しているこ とは確認されたが, *B. animalis* subsp. *lactis* LKM512 の 生菌数は *B. adolescentis* JCM 1275^T の生菌数より高かっ た. これらの結果は, ビフィズス菌がプトレッシンを増 加させる能力は種によって異なることを示唆した.

腸管内腔の環境の酸性化がプトレッシン生産に及ぼす 影響をさらに解析する目的で、ヒト糞便(n=6)を様々 なpHの緩衝液に懸濁し、24hインキュベートしたとこ ろ、pH5.6ではすべての糞便サンプルでプトレッシン濃 度が増加した.これは、腸管内腔環境の酸性化がヒト腸 内細菌によるプトレッシン生産を引き起こす可能性があ ることを示唆している(Fig.4H).細菌細胞を強い酸に より死滅させるために糞便(n=5)を0.1NHCIに懸濁 した実験では、プトレッシン濃度の増加はわずかにとど まったことから、糞便懸濁液を酸性化した際のプトレッ シン生成は酸性条件による腸内細菌の細胞の破裂に由来 するのではなく、生菌の生理活動によることが強く示唆 された.

*En. faecalis*と他の腸内細菌種との共同によるプトレッシン生産

本研究で同定されたハイブリッド・プトレッシンシス テムの後半に寄与する En. faecalis (Fig.2) は、ヒト腸 内常在菌叢最優勢種であり (Qin et al., 2010). その占有 率の高さから、腸管内腔における代謝物のフローに重要 な役割を果たすと予想される.しかし.本研究で同定さ れたハイブリッド・プトレッシンシステムの前半に寄与 する大腸菌は腸管内腔では比較的菌数が少ない菌種であ る. したがって、ハイブリッド・プトレッシン生産系に おいて大腸菌によって担われる前半部分が他の腸内常在 菌により代替可能なことを示す目的で、AdiA および AdiC を有する種を in silico 分析によって同定した. 同定され た Citrobacter youngae ATCC 29220 および Fusobacterium *varium* ATCC 27725 の 2 種 そ れ ぞ れ を,野 生 型 *En*. faecalis (V583) と共培養した. C. youngae と En. faecalis を共培養した場合のプトレッシン生産は, C. youngae を 単独で培養した際と比較して増加する傾向があった (Fig.5A). 一方で, F. varium と En. faecalis を共培養し た場合の培養上清中のプトレッシン濃度は, F. varium を 単独で培養した場合よりも28倍以上高かった(Fig.5A). さらに, F. varium および野生型 En. faecalis を共定着さ せたノトバイオートマウスの糞便中のプトレッシン濃度 は, 野生型 En. faecalis または F. varium を単独定着させ たノトバイオートマウスの糞便中のプトレッシン濃度よ りも有意に高かった (p<0.05) (Fig.5B). これらの結



Figure 5. General putrescine production pathway from arginine via agmatine in the human intestinal microbiome. (A) Extracellular putrescine concentration in monoculture of *C. youngae* ATCC 29220 or *F. varium* ATCC 27725, and coculture of *C. youngae* ATCC 29220 or *F. varium* ATCC 27725 with wild-type *En. faecalis* (V583). (B) Fecal putrescine concentration in gnotobiotic mice inoculated with *F. varium* ATCC 27725 and wild-type *En. faecalis* (V583). Mono- and cocultures of these bacteria were conducted under anaerobic conditions at 37 °C for 24 h in LB-RGC.

果は、AdiA および AdiC ホモログを有するいくつかの腸 内常在菌種が、ハイブリッド・プトレッシン生産系に寄 与していることを示唆した. C. youngae を単独で培養し た際のアグマチン生産は培地の pH が 5.0 のとき最も高 かったが、F. varium を単独培養した際は、培地の pH が 7.0 のとき最も高かった. この結果は C. youngae の AdiC/AdiA 経路が、大腸菌のそれと同様に、環境の酸性 化によって活性化されるが、F. varium の経路は中性環 境でも機能することを示唆していた.

考 察

腸内細菌の代謝物は、単一の細菌細胞内の反応によっ て、または腸管内の異なる細菌種における連続した反応 によって合成されると考えられている. 腸内細菌由来の 代謝産物の合成に関与する酵素の実験的同定を目指した いくつかの研究が進行中である (Degnan et al., 2014; Rogowski et al., 2015; Wu et al., 2015) が、これらの研究 は個々の細菌の細胞内経路のみに着目した研究である. 一方で、2つ以上の腸内細菌が協同して行う代謝反応を 遺伝子レベルで解析した研究はごくわずかである. 例え ば、腸内細菌による多糖類のクロスフィーディングシス テムについて報告した優れた研究 (Rakoff-Nahoum et al., 2016) では、細菌間の共生は、このクロスフィーディン グに関与する2つの細菌種のうちの1種の細菌における 遺伝子破壊によって検証されている. これに対し本研究 において我々は、2つの細菌による新規プトレッシン・ ハイブリッドシステムを、本システムに関与する双方の

細菌種の遺伝子破壊株および相補株を使用して実験的に 証明した.

この研究では、腸管内腔の生態系におけるポリアミン の一種であるプトレッシンの代謝に焦点を当て、2つの 腸内細菌種 (En. faecalis と E. coli) の独立した代謝経 路と輸送システムが組み合わさることによりプトレッシ ンの生産が誘導されることを遺伝子レベル, また, in vitroと in vivo の双方において証明した. しかしながら in vivo 実験においては、結腸内腔中のプトレッシン濃 度は in vitro 実験における培養上清中のプトレッシン濃 度と比較して著しく低かった.これは、生産されたプト レッシンが宿主によって吸収された可能性を示唆してお り、この点を明確に実証するためにはさらなる研究が必 要である. En. faecalisは大腸菌との共培養に加えて、 AdiAとAdiCのホモログを持つC. youngaeまたはF. varium との共培養によっても、プトレッシンを生成す るため、この経路によるプトレッシンの生成は、En. faecalisと E. coliという特定の菌種の組み合わせには依 存しない. ヒト腸内には酵素 AdiA, AdiC, AguA, お よび/またはAguDのホモログを有する多くの種類の細 菌が存在するために、この経路を介してプトレッシンを 生産することができる無数の組み合わせがある可能性が 高い. アグマチンを生産するための至適 pH は, 単一培 養では C. youngae と F. varium で異なることから、ヒト 腸内においては,酸性条件化で活性化される AdiC/AdiA システムと中性条件下でも機能する AdiC/AdiA システ ムが共存している可能性が考えられた.

本研究で観察されたプトレッシン生産の誘導は、酸性

環境での生存を目的とした大腸菌の耐性システムによっ て引き起こされ、プトレッシン生産は酸性のpH条件に 依存した.大腸菌は、2つのアルギニンデカルボキシラー ゼ、SpeA (Boyle et al., 1984) および AdiA (Gong et al., 2003)を有し、これらの酵素の触媒する反応によってア グマチンを生合成できる. adiAとオペロンを形成して いる adiC は、細胞内のアグマチンを外部のアルギニン と交換するアルギニン-アグマチンアンチポーターを コードする (Gong et al., 2003).大腸菌細胞内では、 AdiC によって細胞外から取り込まれたアルギニンは AdiA によって脱炭酸され、この際にプロトンを消費す るとともにアグマチンを生成し、環境のpHを上昇させ る. このシステムは低pH に反応して引き起こされ、「耐 酸性システム3 (AR3)」として広く研究されてきた (Foster, 2004).

En. faecalisでは、プトレッシンはアグマチンから AguAと AguB によって触媒される連続的な反応によっ て合成される (Landete et al., 2010; Llacer et al., 2007). En. faecalisのアグマチン生合成経路はこれまでに報告 されておらず、アグマチン生合成酵素のホモログも存在 しないので、この細菌はアグマチンを細胞外から取り込 み、これをプトレッシンに変換すると考えられる. アグ マチンの取り込みは、細胞内のプトレッシンを細胞外の アグマチンと交換するアグマチン-プトレッシンアンチ ポーター (AguD) によって行われる (Driessen et al., 1988). 細胞内のアグマチンをプトレッシンに変換する アグマチンデイミナーゼを含む経路は、AguA、AguB、 およびAguDからなり、培地を中和することによって En. faecalisの増殖に最適な環境を作り出すことができ る (Suárez et al., 2013). しかしながら、この経路は環境 pHによって影響されない.一方でこの経路は培地中に 存在するアグマチンに誘導され、グルコースによって完 全に抑制される.以上の結果は, En. faecalisのアグマ チンデイミナーゼ経路が耐酸性においてだけでなくエネ ルギー生産においても重要な役割を果たすことを示唆し た Suarez らの報告を裏付けるものである (Suárez et al., 2013).

ビフィス菌のよく知られている健康への効能は、これ らの細菌による酢酸および乳酸の生産による腸管内腔の 環境の酸性化である.例えば便秘は、これらの短鎖脂肪 酸によって刺激された消化管の蠕動運動の活性化によっ て軽減することができる(Shi et al., 2016).これに加え、 ビフィズス菌によって産生される有益な代謝産物が直接 的に効用を持つことも知られている.例えば、これまで の研究で、ビフィズス菌が酢酸産生を介して病原体によ る感染から大腸腸管を保護することが示された(Fukuda et al., 2011).しかしながら、ビフィズス菌に由来する

短鎖脂肪酸が腸内常在菌に由来する他の代謝産物の産生 を誘導するという報告はこれまでにない、本研究では、 ビフィズス菌による腸内環境の酸性化が in vitro および in vivo での大腸菌と En. faecalisの共培養によるポリア ミンの合成と放出を促進するという全く新しい機構を解 明した.本研究の知見は、ビフィズス菌が健康増進効果 を直接的にもたらすという既存の考え方から、ビフィズ ス菌が腸内細菌叢による代謝産物生成の改変を介した健 康増進効果を間接的にもたらすという新しい考え方へ の、大きなパラダイムシフトを示している、興味深いこ とに、プトレッシン生産は大腸菌およびEn. faecalisの 増殖を抑制したいくつかのビフィズス菌(B. longum お よび B. pseudocatenulatum) を含む共培養系では阻害さ れた、この知見は、腸内常在細菌、特にAdiC/AdiA ま たはAguD/AguAを有する細菌の増殖を抑制しない特定 のビフィズス菌が、このハイブリッドシステムを介した プトレッシン生産の誘導に関与している可能性があるこ とを示唆している.

結論として,我々は腸管内腔において酸を産生する細 菌による環境の酸性化によって引き起こされる,アルギ ニンを原料としアグマチンを経由する2つの異なる細菌 種にまたがる新規プトレッシン生産経路を発見した.こ の経路は,ビフィズス菌による酸の産生,この酸による 大腸菌の耐酸性システムの誘導, En. faecalisのエネル ギー生産システムの誘導という,関連する個々の細菌に おける独立した戦略からなる.

我々は,腸内細菌叢による他の代謝産物の生産におい ても同様の菌種間の関連が存在する可能性が高く,腸内 常在菌叢による代謝産物産生を解析する上で,このよう な菌種間にまたがる合成系の可能性を考慮することは重 要であると考えている.

要 約

これまでの研究で我々は、ヒト腸管内腔に豊富に見ら れるポリアミンの一種であるプトレッシン濃度がアルギ ニンとプロバイオティクスビフィズス菌の投与後に増加 することを報告したが、そのメカニズムは不明であった. 本研究では、生育環境の酸性化(中性から6.5未満の pHの低下)によって引き起こされた2つの細菌グルー プの物質代謝・輸送経路が組み合わさることで、アルギ ニンを原料とし、アグマチンを反応中間体とした新規プ トレッシン生合成経路を発見し、その機構を遺伝子レベ ルで実証した.この経路は、ビフィズス菌に代表される 細菌が放出する酸がトリガーとなり発動し、大腸菌に代 表される細菌のアルギニン依存性の酸耐性機構および、 Enterococcus faecalis に代表される細菌のアグマチンデイ

新

ミナーゼによるエネルギー獲得機構が組み合わることで 成立する.この経路は、複雑な細菌叢を形成する腸管内 腔において複数の細菌の独立した生存戦略が偶然に組み 合わさった結果、ヒトに大きな影響を与える生理活性物 質であるポリアミンが生成されるという点が特徴的であ る.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 北田 雄祐,村松 幸治,栗原 新,松本 光晴.2015.腸内常 在菌の異なる環境適応によるプトレッシン産生経路の解 明.日本ポリアミン学会第6回年会.1月19日.東京.
- 2) 北田 雄祐,村松 幸治,栗原 新,松本 光晴.2015. 腸管内 プトレッシンは腸内細菌の異なる環境適応を介して高生 産される.日本農芸化学会2015年度大会3月29日.岡山.
- 3) 北田 雄祐,村松 幸治,栗原 新,松本 光晴. 2015. 腸内環 境の酸性化による腸内ボリアミン増加.日本ポリアミン学 会第7回年会.11月13日.京都.
- 4) 北田 雄祐,栗原新,村松 幸治,松本 光晴.2016.腸内環 境の酸性化は腸内細菌由来の生理活性物質であるポリア ミンを増加させる.日本農芸化学会大会2016年度大会.3月 28日.札幌.
- 5) 北田 雄祐, 東樹 宏和, 栗原 新, 松本 光晴. 2017. 腸内マ イクロバイオーム内の異菌種間の独立代謝系を介したプ トレッシン産生経路. 日本農芸化学会大会2017年度大会. 3 月19日. 京都.
- 6) 北田 雄祐,東樹 宏和,栗原新,松本 光晴.2017.腸内マ イクロバイオーム内の異菌種間の異なる代謝系を介した ポリアミン産生.日本ポリアミン学会第8回年会.1月20日. 習志野.

原著論文

 Kitada, Y., Muramatsu, K., Toju, H., Kibe, R., Benno, Y., Kurihara, S. & Matsumoto, M. 2018. Bioactive polyamine production by a novel hybrid system comprising multiple indigenous gut bacterial strategies. Sci. Adv. 4: eaat0062.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成に よって開設された腸内細菌共生機構学寄付講座において 行われたものである.本助成を賜った発酵研究所に対し てここに厚く御礼申し上げます.本寄付講座世話人であ る石川県立大学・熊谷英彦参与のご支援とご協力に感謝 の意を表します.

文 献

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. & Mori, H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol. Syst. Biol. 2.

- Boyle, S.M., Markham, G.D., Hafner, E.W., Wright, J.M., Tabor, H. & Tabor, C.W. 1984. Expression of the cloned genes encoding the putrescine biosynthetic enzymes and methionine adenosyltransferase of *Escherichia coli* (*speA*, *speB*, *speC* and metK). Gene **30**: 129-136.
- Bullen, C.L., Tearle, P.V. & Willis, A.T. 1976. Bifidobacteria in the intestinal tract of infants: an in-vivo study. J. Med. Microbiol. 9: 325-333.
- Burrell, M., Hanfrey, C.C., Murray, E.J., Stanley-Wall, N.R. & Michael, A.J. 2010. Evolution and multiplicity of arginine decarboxylases in polyamine biosynthesis and essential role in Bacillus subtilis biofilm formation. J. Biol. Chem. 285: 39224-39238.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. & Madden, T.L. 2009. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10: 421.
- de Vries, W. & Stouthamer, A.H. 1968. Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol, and xylose by bifidobacteria. J. Bacteriol. 96: 472-478.
- Degnan, P.H., Barry, N.A., Mok, K.C., Taga, M.E. & Goodman, A.L. 2014. Human gut microbes use multiple transporters to distinguish vitamin B 12 analogs and compete in the gut. Cell host & microbe 15: 47-57.
- Driessen, A., Smid, E.J. & Konings, W.N. 1988. Transport of diamines by *Enterococcus faecalis* is mediated by an agmatine-putrescine antiporter. J. Bacteriol. **170**: 4522-4527.
- Eisenberg, T., Abdellatif, M., Schroeder, S., Primessnig, U., Stekovic, S., Pendl, T., Harger, A., Schipke, J., Zimmermann, A., Schmidt, A., Tong, M., Ruckenstuhl, C., Dammbrueck, C., Gross, A.S., Herbst, V., Magnes, C., Trausinger, G., Narath, S., Meinitzer, A., Hu, Z., Kirsch, A., Eller, K., Carmona-Gutierrez, D., Buttner, S., Pietrocola, F., Knittelfelder, O., Schrepfer, E., Rockenfeller, P., Simonini, C., Rahn, A., Horsch, M., Moreth, K., Beckers, J., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Neff, F., Janik, D., Rathkolb, B., Rozman, J., de Angelis, M.H., Moustafa, T., Haemmerle, G., Mayr, M., Willeit, P., von Frieling-Salewsky, M., Pieske, B., Scorrano, L., Pieber, T., Pechlaner, R., Willeit, J., Sigrist, S.J., Linke, W.A., Muhlfeld, C., Sadoshima, J., Dengjel, J., Kiechl, S., Kroemer, G., Sedej, S. & Madeo, F. 2016. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. Nat. Med. 22: 1428-1438.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C. & Antonacci, L. 2009. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. Nat. Cell Biol. 11: 1305-1314.
- Foster, J.W. 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. Nature Reviews Microbiology 2: 898-907.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J.M., Topping, D.L. & Suzuki, T. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. Nature 469: 543-547.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.
- Gerner, E.W. & Meyskens, F.L. 2004. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. Nature Reviews Cancer 4: 781-792.
- Gong, S., Richard, H. & Foster, J.W. 2003. YjdE (AdiC) is the arginine: agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid

resistance in Escherichia coli. J. Bacteriol. 185: 4402-4409.

- Gupta, V.K., Scheunemann, L., Eisenberg, T., Mertel, S., Bhukel, A., Koemans, T.S., Kramer, J.M., Liu, K.S., Schroeder, S. & Stunnenberg, H.G. 2013. Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner. Nat. Neurosci. 16: 1453-1460.
- Kibe, R., Kurihara, S., Sakai, Y., Suzuki, H., Ooga, T., Sawaki, E., Muramatsu, K., Nakamura, A., Yamashita, A. & Kitada, Y. 2014. Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. Sci. Rep. 4: 4548.
- Landete, J.M., Arena, M.E., Pardo, I., Manca de Nadra, M.C. & Ferrer, S. 2010. The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synthesis from agmatine via agmatine deiminase. Int. Microbiol. 13: 169-177.
- Laukaitis, C.M. & Gerner, E.W. 2011. DFMO: targeted risk reduction therapy for colorectal neoplasia. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 25: 495-506.
- Llacer, J.L., Polo, L.M., Tavarez, S., Alarcon, B., Hilario, R. & Rubio, V. 2007. The gene cluster for agmatine catabolism of *Enterococcus faecalis*: study of recombinant putrescine transcarbamylase and agmatine deiminase and a snapshot of agmatine deiminase catalyzing its reaction. J. Bacteriol. 189: 1254-1265.
- Matsumoto, M. & Benno, Y. 2007. The relationship between microbiota and polyamine concentration in the human intestine: a pilot study. Microbiol. Immunol. 51: 25-35.
- Matsumoto, M., Kakizoe, K. & Benno, Y. 2007. Comparison of fecal microbiota and polyamine concentration in adult patients with intractable atopic dermatitis and healthy adults. Microbiol. Immunol. 51: 37-46.
- Matsumoto, M., Kibe, R., Ooga, T., Aiba, Y., Kurihara, S., Sawaki, E., Koga, Y. & Benno, Y. 2012. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. Sci. Rep. 2: 233.
- Matsumoto, M., Kurihara, S., Kibe, R., Ashida, H. & Benno, Y. 2011. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. PLoS One 6: e23652.
- Pegg, A.E. 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. Biochem. J. 234: 249.
- Perez-Casal, J., Caparon, M. & Scott, J. 1991. Mry, a trans-acting positive regulator of the M protein gene of Streptococcus pyogenes with similarity to the receptor proteins of two-component regulatory systems. J. Bacteriol. 173: 2617-2624.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Meta, H.I.T.C., Bork, P., Ehrlich, S.D. & Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 464: 59-65.
- Rakoff-Nahoum, S., Foster, K.R. & Comstock, L.E. 2016. The evolution of cooperation within the gut microbiota. Nature **533**:

255-259.

- Richard, H. & Foster, J.W. 2004. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. J. Bacteriol. 186: 6032-6041.
- Rijkers, G.T., Bengmark, S., Enck, P., Haller, D., Herz, U., Kalliomaki, M., Kudo, S., Lenoir-Wijnkoop, I., Mercenier, A., Myllyluoma, E., Rabot, S., Rafter, J., Szajewska, H., Watzl, B., Wells, J., Wolvers, D. & Antoine, J.M. 2010. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. J. Nutr. 140: 671S-676S.
- Rogowski, A., Briggs, J.A., Mortimer, J.C., Tryfona, T., Terrapon, N., Lowe, E.C., Baslé, A., Morland, C., Day, A.M. & Zheng, H. 2015. Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large intestine. Nature communications 6.
- Sharon, G., Garg, N., Debelius, J., Knight, R., Dorrestein, P.C. & Mazmanian, S.K. 2014. Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. Cell Metab. 20: 719-730.
- Shi, Y., Chen, Q., Huang, Y., Ni, L., Liu, J., Jiang, J. & Li, N. 2016. Function and clinical implications of short-chain fatty acids in patients with mixed refractory constipation. Colorectal Dis. 18: 803-810.
- Soda, K., Dobashi, Y., Kano, Y., Tsujinaka, S. & Konishi, F. 2009. Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. Exp. Gerontol. 44: 727-732.
- Suárez, C., Espariz, M., Blancato, V.S. & Magni, C. 2013. Expression of the agmatine deiminase pathway in *Enterococcus faecalis* is activated by the AguR regulator and repressed by CcpA and PTS Man systems. PLoS One 8: e76170.
- Sugiyama, Y., Nara, M., Sakanaka, M., Gotoh, A., Kitakata, A., Okuda, S. & Kurihara, S. 2017. Comprehensive analysis of polyamine transport and biosynthesis in the dominant human gut bacteria: Potential presence of novel polyamine metabolism and transport genes. Int. J. Biochem. Cell Biol. 93: 52-61.
- Tabor, C.W. & Tabor, H. 1985. Polyamines in microorganisms. Microbiol. Rev. 49: 81.
- Thurlow, L.R., Thomas, V.C. & Hancock, L.E. 2009. Capsular polysaccharide production in *Enterococcus faecalis* and contribution of CpsF to capsule serospecificity. J. Bacteriol. 191: 6203-6210.
- Uda, K., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y. & Bamba, T. 2003. Rapid absorption of luminal polyamines in a rat small intestine ex vivo model. J. Gastroenterol. Hepatol. 18: 554-559.
- Wu, M., McNulty, N.P., Rodionov, D.A., Khoroshkin, M.S., Griffin, N.W., Cheng, J., Latreille, P., Kerstetter, R.A., Terrapon, N. & Henrissat, B. 2015. Genetic determinants of *in vivo* fitness and diet responsiveness in multiple human gut Bacteroides. Science **350**: aac5992.
- Yatsunenko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R. & Gordon, J.I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature **486**: 222-227.

β-ガラクト-*N*-ビオシド構造を有する globo H, Gb5, および GA 1 糖鎖に対する 2 種のラクト-*N*-ビオシダーゼの特異性

後藤 愛那, 栗原 新, 片山 高嶺

石川県立大学生物資源環境学部寄付講座腸内細菌共生機構学 〒921-8836 石川県野々市市末松

Different specificities of two lacto-*N*-biosidases towards β-linked galacto-*N*-biose-containing sugar chains of globo H, Gb5, and GA1 Aina Gotoh, Shin Kurihara, Takane Katayama

Host-Microbe Interaction Research Laboratory Faculty of Bioresources and Environmental Sciences Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

Two independently evolved lacto-*N*-biosidases (LnbX and LnbB) show different specificities towards the sugar chains of globo- and ganglio-series glycosphingolipids. LnbX, a member of glycoside hydrolase family 136, from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, liberated galacto-*N*-biose (GNB: Gal β 1-3GalNAc) and fucosyl GNB (a type-4 trisaccharide) from Gb5 pentasaccharide and globo H hexasaccharide, respectively. LnbB, a member of the glycoside hydrolase family 20, from *Bifidobacterium bifidum*, released GNB from Gb5 and GA1 oligosaccharides. This is the first report demonstrating enzymatic release of β -linked GNB from natural substrates.

Key words: Bifidobacterium, lacto-N-biosidase, glycosphingolipid

緒 言

腸内細菌叢は宿主の健康に大きな影響を及ぼす.例えば、腸内細菌によって産生される短鎖脂肪酸は、マウスの体重、エネルギーバランス、および免疫応答に影響を与えることや(Kimura et al., 2013; Maslowski et al., 2009)、

E-mail:

後藤愛那	(aina.g1985@gmail.com)(現所属:京都大学大学院生
	命科学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町),
栗原 新	(skurihara@waka.kindai.ac.jp)(現所属:近畿大学生
	物理工学部 〒 649-6433 和歌山県紀の川市西三谷 930),
片山高嶺	(takane@lif.kyoto-u.ac.jp)(現所属:京都大学大学院生
	命科学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町)
共同研究	佐 白
加藤紀彦	(京都大学大学院生命科学研究科),
杉山友太	(京都大学大学院農学研究科),
本多裕司	(石川県立大学生物資源環境学部),
櫻間晴子	(石川県立大学生物資源環境学部),
神戸大朋	(京都大学大学院生命科学研究科),
芦田 久	(近畿大学生物理工学部),
北岡本光	(国立研究開発法人農研機構),
山本憲二	(石川県立大学生物資源環境学部)

Clostridium 属細菌によって産生される酪酸が制御性T 細胞の分化を誘導することなどが知られている. さらに, マウスの不安行動や認知機能障害といった行動異常も, 腸内細菌代謝物に関連していることが報告されている (Diaz Heijtz *et al.*, 2011; Goehler *et al.*, 2008; Hsiao *et al.*, 2013). したがって,宿主の健康にとって腸内細菌叢の 構成や影響を理解することは不可欠である.

難消化性多糖(食物繊維)は、腸内細菌叢の組成に影響を与える要因の1つであり、有用微生物の増殖を促進するプレバイオティクス(一般的にオリゴ糖)の開発を目指す研究において注目を集めている(Brownawell et al., 2012).成人の腸管内に生息するBacteroides thetaiotaomicronのゲノム上には、多糖類の資化に関与する遺伝子群が多く存在している(Koropatkin et al., 2012).また、乳児腸管内で優占種となるBifidobacterium属細菌には、人乳中で3番目に豊富な固形成分であるヒトミルクオリゴ糖(HMOs)の代謝に特化した酵素が備わっている(Asakuma et al., 2011; Ashida et al., 2009; Kiyohara et al., 2011; Martens et al., 2008; Miwa et al., 2010).これらの腸内細菌は、食餌由来および宿主由来

の糖鎖を分解して増殖することで共生関係を築くため に、これらのグリコシダーゼを進化させた可能性が高い. そのため、正常な腸内細菌叢の形成と維持の基盤を理解 するためには、グリコシダーゼの特徴を詳細に解明する ことが必要である.このことは、腸上皮細胞表面での *FUT2*によるH抗原(Fuca1-2Gal)の発現と、H抗原か ら腸内細菌由来の1,2-α-L-フコシダーゼによって遊離さ れるフコース(Fuc)が、共生の確立と病原性細菌遺伝 子の発現を減少させるために重要であるという知見から も裏付けられる(Bry *et al.*, 1996).1,2-α-L-フコシダー ゼ(EC 3.2.1.63)は、腸管内生態系に影響を与える特 異的な細菌グリコシダーゼの代表と考えられる (Katayama *et al.*, 2004).

HMOsの主成分であるラクト-N-テトラオース(LNT: Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) をラクト-N-ビオース Ι (LNB: Galβ1-3GlcNAc) およびラクトース (Lac) に 分解する酵素ラクト-N-ビオシダーゼ(EC 3.2.1.140)も, 腸内細菌と宿主の共生に重要な酵素であると思われる. これまで2つの異なるラクト-N-ビオシダーゼが単離さ れているが (Sakurama et al., 2013; Sano et al., 1992; Wada et al., 2008), 一方はグリコシドヒドロラーゼファミリー (GH) 20 に属し,他方は最近になって GH136 に分類さ れることとなった(Henrissat & Davies 1997). これらは それぞれ Bifidobacterium bifidum 由来のラクト-N-ビオ シダーゼ (LnbB), および Bifidobacterium longum subsp. longum 由来の(LnbX) である. 我々はこれまでに. GH20 LnbB が未修飾 LNB 構造に対して厳密な特異性を 示すのに対し. LnbX は GalNAcB1-3GlcNAc (α-ジスト ログリカンの 0-マンノシルグリカンに見られる二糖構 造) (Yoshida-Moriguchi et al., 2010), およびLNBと2'-フコシル LNB (Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc) を遊離するこ とを報告している (Sakurama et al., 2013; Wada et al., 2008). 構造的に考えると, LnbBはGH20の主要メンバー であるβ-N-アセチルヘキソサミニダーゼの活性中心に おいて非還元末端側にサブサイトを拡大させる(-2サ ブサイト)ことで進化したと考えられる. GH 20 ラクト -N-ビオシダーゼは、Bifidobacterium 属および Streptomyces 属が有しているが、これら2つの細菌間のアミノ酸配列 相同性は最大で38%であり、これらの酵素は異なるプ ロセスで進化してきた可能性が高い. Streptomyces 属に おける進化の原動力が何であったかについて明確な答え はないが, Bifidobacterium 属の場合は, 宿主由来グリカ ン、特にHMOsがその要素であったと考えられる。 LnbXホモログはこれまで5つの属 (*Bifidobacterium*, Clostridium, Ruminococcus, Roseburia, および Enterococcus) で同定されている. ラクト-N-ビオシダーゼ活性自体が 自然界では稀であることを考えると、2つの全く異なる

ラクト-N-ビオシダーゼが, Bifidobacterium という1つ の属で異なる進化を遂げてきたことは大変興味深い. す なわち,本酵素は腸内細菌の炭素源獲得の分子基盤を理 解するため,また宿主一細菌の共生および共進化の分子 基盤を理解するための重要な研究対象となりえる.

本論文では、LnbX および LnbB の新規な糖鎖分解活 性として、グロボ系およびガングリオ系スフィンゴ糖脂 質のオリゴ糖に対する活性を調べた.これは、β-ガラク ト-*N*-ビオース(GNB:Galβ1-3GalNAc)を天然基質か ら遊離させる活性を見出した最初の報告である.

実験方法

基質および試薬

LNB- β -pNP およびラクト-N-フコペンタオースI (LNFP I: Fuca1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)は Sigma-Aldrich (MO, USA)から,GNB- β -pNP は東京化成 工業株式会社(Tokyo)から,LNTはDextra Laboratories (Reading,UK)から,globo H,Gb5およびGA1オリゴ 糖はElicityl (Crolles,France)から購入した.Gb5は Asahipak NH 2 P-90 20 F カラム(Showa Denko,Tokyo) を用い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって さらに精製した.

酵素の精製

LnbX および LnbB は、既報の方法に従い、His タグ付 加組み換えタンパク質として大腸菌において発現し精製 した (Sakurama *et al.*, 2013; Wada *et al.*, 2008). タンパク 質濃度は、ウシ血清アルブミンを基準として BCA タン パク質アッセイキット (Thermo Scientific, MA, USA) を使用して測定した.

酵素活性測定

酵素反応は 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 中で行った. 基質として *p*NP-糖およびオリゴ糖を使用 した. 酵素の添加により反応を開始し, 30℃で適当な 時間インキュベートし, 直線的な反応変化が得られる範 囲において速度を決定した. LnbXの濃度は, 0.09-0.3 µg/mL (LNB-β-*p*NP の場合), 4-6µg/mL (GNB-β-*p*NP の場合), 50-60µg/mL (Gb5 の場合), ま たは 970µg/mL (globo H の場合) とした. LnbB の濃 度は, 0.1-0.8µg/mL (LNB-β-*p*NP および GNB-β-*p*NP の場合), または 1-2µg/mL (Gb5 および GA1 の場合) とした. 速度論的パラメータ測定では, 基質濃度はそれ ぞれの K_m 値の 0.3 から 2 倍までの範囲で行った. 反応 停止は, 炭酸ナトリウム添加 (*p*NP-糖の場合) または 95℃で3分間加熱(オリゴ糖の場合)で行った. 遊離し た pNP量は 405 nm の吸光度を測定して決定した.オリ ゴ糖の加水分解は、Asahipak NH 2 P-50 4 E カラム(昭 和電工)を用いた HPLC システムで、73%アセトニト リル 1mL/分の流速で溶出を行い、荷電エアロゾル検出 器(Thermo Scientific)を用いてモニターした。Globo Hを基質とした場合、遊離した Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc からフコシル基を除去するために、HPLC 分析に先立っ て、反応生成物を 1,2- α -L-フコシダーゼ(Katayama *et al.*, 2004)で処理した。検量線は、既知濃度の Lac および GNBを用いて作製した。GraFit ソフトウェア(Erithacus Software, West Sussex, UK)を使用し、Michaelis-Menten式(競合的阻害を含む)に曲線近似することに よりパラメータを算出した。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI-TOF) 質量分析 (MS)

アセトン処理によってタンパク質を除去した上清を乾燥させ、マトリックスとして 20 mg/mLの 2,5-ジヒドロキシ安息香酸含有 50 % xタノール(Sigma-Aldrich)に溶解した. MALDI-TOF MS分析は、UltrafleXtreme (BrukerDaltonics, MA, USA)を使用し、陽イオンモードで行った.

結 果

GalNAc による LnbX 活性の阻害

LnbXはLNTに対する触媒効率が高いことから (Sakurama et al., 2013). LNT を主要基質としていると 考えられるが、LnbX ホモログは自然界で非常に稀にし か存在しないため、他の酵素活性を示すかどうかを調べ ることとした. そのためにまず,宿主由来糖タンパク質, 糖脂質、およびグリコサミノグリカンの糖鎖を構成する 単糖である Fuc, Gal, GalNAc, Glc, GlcA, GlcNAc, Man, Neu5Ac, および Xyl による LnbX の活性阻害効 果を調べた. 基質としてLNB-β-pNPを使用して調べた 結果, GalNAcのみが活性を阻害することを見出した (Fig.1). GalNAcによる阻害は、Ki値6.4mMの競合阻 害であったが, Galや GlcNAc(LNB 構成単糖)では阻 害効果が見られなかった. LNB-β-pNP および GalNAc β1-3GlcNAc-β-pNP に対する LnbX の K_m値が同程度であ ることを考慮すると、LnbXは-1サブサイトとして GlcNAcよりも GalNA をより強く認識すると考えられ る. なお、LnbX は GalNAc-β-pNP に作用しないことが 既に分かっている (Sakurama et al., 2013).

GNB 含有オリゴ糖に対する LnbX と LnbB の活性 まず最初に LnbX による GNB-β-pNP の加水分解活性

を調べた.比較のためGH20LnbBの活性についても同 時に評価した. LNB-β-pNPに対する LnbX および LnbB の速度論的パラメータは(Table 1),以前の報告と同程 度であった (Ito et al., 2013: Sakurama et al., 2013). 予想 通り、LnbXはGNB-β-pNPを加水分解し、比活性は LNB-β-pNPの1/50程度であった(0.51U/mg対25U/ mg). ただし, 阻害反応で得られた結果を反映して, LnbXはLNB-β-pNPよりもGNB-β-pNPに対して低い *K*_m値を示した (<0.05 mM対 0.12 mM). GH20 LnbB は, LNB-β-pNPと比較して1/3程度の効率でGNB-β-pNPを 加水分解した (2.5U/mg対 7.7U/mg). LnbBはGH20 β-N-アセチルヘキソサミニダーゼから発生したと考え られ、そのほとんどはβ-N-アセチルグルコサミニドと β-N-アセチルガラクトサミニドの両方に等しく作用す るため、LnbBがGNB-β-pNPに対して活性を持つこと は驚くべきことではない. ムチン型 0-グリカンに存在 する α 結合型 GNB に対しては、LnbX と LnbB のどちら も作用しなかった.

次に、LnbX および LnbB がグロボシドおよびガング リオシド由来の GNB 含有天然オリゴ糖を加水分解でき るかどうかを調べた. LNB 含有糖 LNT および LNFP I についても参考のために調査した. 薄層クロマトグラ フィー分析により、LnbX が LNT, LNFP I, Gb 5, お よび globo H に作用するのに対し、LnbB は LNT, Gb5, および GA 1 に作用することが明らかとなった(Fig.2). LnbB は GM1 には作用しなかった. これらの基質の加 水分解は、MS分析によっても確認した(LNT 加水分解



Fig. 1. LNB-β-pNP-hydrolyzing activity of LnbX in the presence of various monosaccharides. The reaction mixture (total volume of 50 µL) consisting of 0.23 µg/mL LnbX and 1 mM LNB-β-pNP in 200 mM sodium phosphate buffer (pH6.0) was incubated in the absence (control) and presence of 10 mM monosaccharide (each) for 15 min at 30 °C. This figure is modified from Figure 2 of Gotoh *et al.*, (2015). Carbohydr. Res., **408**:18–24.

後藤 愛那, 栗原 新, 片山 高嶺

	LnbX	(GH136) from <i>B</i> .	longum	LnbB (GH20) from B. bifidum				
	$K_{\rm m}$ (mM)	$k_{\text{cat}} \left(\mathbf{s}^{-1} \right)$	sp. act. ^a (U mg ⁻¹)	$K_{\rm m}({ m mM})$	$k_{\text{cat}} (\mathrm{s}^{-1})$	sp. act. ^a (U g^{-1})		
LNB-β- <i>p</i> NP	0.12	88	25	<0.05 ^b	16	7.7		
GNB-β- <i>p</i> NP	<0.05 ^b	1.5	0.51	<0.05 ^b	4.9	2.5		
LNT	0.40°	110 ^c	ND ^d	0.63 ^c	42°	ND		
LNFP I	15 ^c	14 ^c	ND	-	-	nd ^e		
Gb5 ^f	2.5	0.84	0.21	3.3	0.029	0.0094		
Globo H ^f	ND	ND	0.0051	-	-	nd		
GA1 ^f	-	-	nd	ND	ND	0.049		

Table 1. Activities of LnbX and LnbB on GNB-containing sugars.

^aSpecific activity was determined at the substrate concentration of 5 mM.

^bThe $K_{\rm m}$ values were too low to be determined.

°Data from Sakurama et al., (2013) (measured at 25 °C)

^dND, not determined.

^end, not detected.

^fOligosaccharides were used as the substrate.

This table is modified from Table 2 of Gotoh *et al.*, (2015). Carbohydr. Res., **408:**18–24.

については Lac(計算値 365.1;実測値 365.1)および LNB(計算値 406.1;実測値 406.1 または 406.2), LNFP I については Lac(実測値 365.1)および 2'-フコシル LNB(計算値 552.2;実測値 552.3), Gb5 については GNB(計算値 406.1;実測値 406.1)および Galα1-4Galβ1-4Glc(計算値 527.2;実測値 527.3), globo H について は Galα1-4Galβ1-4Glc(実測値 527.3), および 2'-フコシル GNB(計算値 552.2;実測値 552.3), GA1 については Lac(観測値 365.1)および GNB(観測値 406.1))が検 出された.

Gb 5に対する Lnb X および Lnb B の速度論的パラメー タと、Gb5 および globo H に対する LnbX の比活性、な らびに Gb5 および GA1 に対する LnbB の比活性を決定 した. LnbX は、GNB- β -pNP に対して LNB- β -pNP より 低い K_m 値を示す一方で(<0.05 mM 対 0.12 mM)、Gb5 に対しては LNT よりも6 倍高い K_m 値を示した(2.5 mM 対 0.4 mM). k_{cat} 値の差は、LNT と Gb5 で 130 倍(110 s⁻¹ 対 0.84 s⁻¹)であり、これは LNB- β -pNP と GNB- β -pNP との差(60 倍:83 s⁻¹ 対 1.5 s⁻¹)よりも2 倍大きかった. Gb5 は LNT と比較して1つ糖が伸長されており、また +1 サブサイトの Gal と+2 サブサイトの Gal との間に a1,4 結合を有するために、LnbX の+サブサイトで立体 障害が生じ得ることを示唆している。基質濃度 5 mM で は、LnbX は globo H を Gb5 の 1/40 程度の効率で加水分 解した(0.0051 U/mg 対 0.21 U/mg). LNT に α1,2 でフ コシル基が付加した LNFP I についても、活性の有意な 低下が観察された. LnbX は GA1 から GNB を遊離しな かったが、Gb5 に対しては作用したことから、LnbX は -1および+1サブサイト間の基質の非平面性には対応 できないと考えられた.

Gb5 に対する LnbB の活性は非常に低く,比活性は GNB- β -pNP との間で170 倍異なり(4.9 s⁻¹ 対 0.029 s⁻¹), K_m 値は少なくとも60 倍異なった(3.3 mM 対 <0.05 mM). LnbB は明確な + サブサイトを持たず,その触媒ポケッ トは溶媒に対して開いているにも関わらず(Ito *et al.*, 2013), K_m 値が脱離基に大きく影響を受けるのは興味深 い. LnbB は LNFP I を加水分解しないのと同様に globo H にも作用しなかった. GA1 に対する LnbB の比活性は Gb5 に対するものよりも5 倍高かった(0.049 U/mg 対 0.0094 U/mg). この場合も, 脱離基の構造の違いが活 性に影響を及ぼしたと考えられる.

考 察

スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴイド塩基を含む糖脂 質のひとつであり,一般に脂肪酸とアミド結合している.



Fig. 2. Specificity analysis of LnbX and LnbB for natural oligosaccharides containing β-linked LNB or GNB disaccharide structures. The reaction mixture containing 2mM of each substrate in 50mM sodium phosphate buffer (pH6.0) (total volume of 50µL) was incubated at 30°C for 12h in the absence and presence of 2 U/mL or 20 U/mL of the enzyme (LnbX or LnbB). Unit (U) was determined using LNB-β-pNP as a substrate. The reaction products were analyzed by thin-layer chromatography using a solvent system of 1-butanol/acetic acid/water (2/1/1). The sugars were visualized with diphenylamine-aniline-phosphoric acid. LNB or GNB was used as the standard (the right most lane in each image). This figure is modified from Figure 3 of Gotoh *et al.*, (2015). Carbohydr. Res., **408**:18–24.

脊椎動物において2糖以上からなる糖鎖構造を有するス フィンゴ糖脂質は、糖鎖のコア構造に基づいて4つのグ ループ(グロボ、ガングリオ、ラクト、ネオラクト系) に分類されている.これらの糖脂質は細胞膜の外葉に見 られ、いわゆる脂質ラフトを形成し、細胞-細胞間の相 互作用およびシグナル伝達に重要な役割を果たしている (Schnar *et al.*, 2009).ヒトにおけるスフィンゴ糖脂質 分解に必要なリソソーム酵素の欠乏はファブリー病およ びテイ・サックス病を引き起こすことが知られている (Patterson 2013; Thomas & Hughes 2014).さらに、ス フィンゴ糖脂質の糖鎖は、いくつかの細菌とその毒素の 宿主細胞への接着に利用されることもある(Basu & Mukhopadhyay 2014; Krivan *et al.*, 1988).したがって、 これらの構造に作用するユニークな酵素を見つけたこと は、複雑なスフィンゴ糖脂質の生理学的および病理学的 機能の分析においても重要と考えられる.

腸内細菌によるスフィンゴ糖脂質の糖鎖の分解につい ては、1988年にLarson et al. (1988)と、その後Falk et al. (1990)が言及している.彼らはラクト系およびネオ ラクト系スフィンゴ糖脂質を分解するビフィズス菌およ びルミノコッカス属細菌由来の酵素を発見しており、そ れらの糖鎖構造は本質的にHMOsと同じである.本研 究では、LnbXとLnbBが、HMOに対する活性と比較す るとかなり低いものの、GNB含有グロボシリーズ(Gb5 とglobo H)およびアシアロガングリオ糖鎖(GA1)の 糖鎖に作用することを見出した.LnbXはGb5および globo Hオリゴ糖からそれぞれ GNB および 2'-フコシル GNB(4型糖鎖)を遊離したが GA1 には作用せず,一 方 LnbB は Gb5 および GA1 から GNB を遊離した.これ は天然基質からβ結合型 GNB を遊離する活性,また, type-4 三糖の遊離活性のそれぞれ最初の報告である.グ ロボシドとガングリオシドが消化管上皮細胞の表面に存 在し、LnbB と LnbX の両方が細胞壁結合型タンパク質 であることを考慮すると,これらの活性は、GNB/LNB 資化経路を持つビフィズス菌が,腸において炭素源を獲 得する際に有利に働くかもしれない(Kitaoka *et al.*, 2005).また,これらの糖鎖は腸内の多くの細菌の受容 体としてとも機能するため,腸内の生態系全体に影響を 与える可能性もある(Karlsson, 1989).

近年、発生学、免疫学、および病原性に関する研究に おいて、糖鎖工学の必要性が高まっている. Globo H は、 乳癌、前立腺癌、肺癌の腫瘍細胞で高発現している糖鎖 マーカーで腫瘍転移に関与していると考えられている (Heimburg-Molinaro et al., 2011). Gb5, いわゆる SSEA-3a は、多系統分化ストレス耐性(muse)細胞、骨髄間質 細胞、胚性幹細胞、および人工多能性幹細胞の細胞表面 に発現しているが、これらの細胞における役割は不明な 点が残されている (Shevinsky et al., 1982; Takahashi et al., 2007; Thomson 1998; Wright & Andrews 2009). その ため、LnbXとLnbBのユニークな活性は、特異的なエ キソグリコシダーゼとエンドグリコセラミダーゼととも に使用することにより, 生理活性に必要な糖鎖部分を同 定するための有用なツールとして利用することが可能と 思われる (Ito & Yamagata, 1986; Sakurama et al., 2012). さらに, 我々は GNB の大量合成法 (~100g) を確立 しているので、これら酵素のグリコシンターゼ化を行え ば、GNB含有複合糖鎖を合成することへも応用可能で ある.

異なる進化起源を有する2つのラクト-*N*-ビオシダーゼに ついて,新規な糖鎖分解活性が明らかとなった.これら の発見は,環境中で利用可能な糖鎖を栄養源とする腸内 細菌と宿主の共生関係を理解するために重要な知見であ る.さらに,これらの酵素は様々な複合糖質の糖鎖をト リミングあるいは合成するツールとして応用可能である.

要 約

進化起源の異なる2つのラクト-N-ビオシダーゼ (LnbXとLnbB) について、グロボ系およびガングリオ 系スフィンゴ糖脂質の糖鎖に対する新規な特異性を見出 した. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 由来 LnbX はGH136に分類されるが、Gb5およびglobo Hからそ れぞれ GNB および 2'-フコシル GNB(4型三糖)を遊離 させることが明らかとなった. Bifidobacterium bifidum 由来 GH20メンバーである LnbB は, Gb5 および GA1 か ら GNB を遊離する活性を有していた. これらの結果は, 天然基質からβ-GNB を遊離する活性の報告としては初 めてである. これらの特徴的な活性は, 腸内細菌叢の形 成においても重要な役割を果たす可能性があり, 同時に スフィンゴ糖脂質の糖鎖の機能を解明するための新しい ツールとして応用が可能である.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1)後藤愛那,阪中幹祥,片山礼子,廣瀬潤子,加藤紀彦, 栗原新,北岡本光,片山高嶺.2016.母乳オリゴ糖分解 酵素LnbXからみるビフィズス菌―ヒトの共生関係.日本 応用糖質科学会平成28年度大会(第65回).9月.広島.

原著論文

 Gotoh, A., Katoh, T., Sugiyama, Y., Kurihar, a S., Honda, Y., Sakurama, H., Kambe, T., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2015. Novel substrate specificities of two lacto-*N*-biosidases towards β-linked galacto-*N*-biosecontaining oligosaccharides of globo H, Gb5, and GA1. Carbohydr. Res., 408:18 – 24.

謝 辞

この研究は、公益財団法人発酵研究所寄付講座助成、 文部科学省ナノテクノロジープラットフォームプログラ ムからの助成金を受けて遂行されました。

参考文献

- Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Ashida, H., Hirose, J. & Kitaoka, M. 2011. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. J. Biol. Chem., 286:34583–34592.
- Brownawell, A.M., Caers, W., Gibson, G.R., Kendall, C.W.C., Lewis, K.D., Ringel, Y. & Slavin, J.L. 2012. Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research, and goals. J. Nutr., **142**:962–974.
- Bry, L., Falk, P.G., Midtvedt, T. & Gordon, J.I. 1996. A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. Science, 273:1380–1383.
- Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H. & Pettersson, S. 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 108:3047–3052.
- Goehler, L.E., Park, S.M., Opitz, N., Lyte, M. & Gaykema, R.P.A. 2008. *Campylobacter jejuni* infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior. Brain.

Behav. Immun., 22:354-366.

- Heimburg-Molinaro, J., Lum, M., Vijay, G., Jain, M., Almogren, A. & Rittenhouse-Olson, K. 2011. Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. Vaccine, 29:8802–8826.
- Henrissat, B. & Davies, G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Curr. Opin. Struct. Biol., 7:637–644.
- Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J. a, Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., Patterson, P.H. & Mazmanian, S.K. 2013. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. Cell, 155:1451–1463.
- Ito, T., Katayama, T., Hattie, M., Sakurama, H., Wada, J., Suzuki, R., Ashida, H., Wakagi, T., Yamamoto, K., Stubbs, K.A. & Fushinobu, S. 2013. Crystal structures of a glycoside hydrolase family 20 lacto-*N*-biosidase from *Bifidobacterium bifidum*. J. Biol. Chem., 288:11795–11806.
- Ito, M. & Yamagata, T. 1986. A novel glycosphingolipid-degrading enzyme cleaves the linkage between the oligosaccharide and ceramide of neutral and acidic glycosphingolipids. J. Biol. Chem., 261:14278–14282.
- Karlsson, K.A. 1989. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. Annu. Rev. Biochem., 58:309–350.
- Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T., Makimura, Y., Hiratake, J., Sakata, K., Yamanoi, T., Kumagai, H. & Yamamoto, K. 2004. Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2-α-L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). J. Bacteriol., **186**:4885–4893.
- Kimura, I., Ozawa, K., Inoue, D., Imamura, T., Kimura, K., Maeda, T., Terasawa, K., Kashihara, D., Hirano, K., Tani, T., Takahashi, T., Miyauchi, S., Shioi, G., Inoue, H. & Tsujimoto, G. 2013. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. Nat. Commun., 4:1829.
- Kiyohara, M., Tanigawa, K., Chaiwangsri, T., Katayama, T., Ashida, H. & Yamamoto, K. 2011. An exo-sialidase from bifidobacteria involved in the degradation of sialyloligosaccharides in human milk and intestinal glycoconjugates. Glycobiology, 21:437–4447.
- Koropatkin, N.M., Cameron, E.A. & Martens, E.C. 2012. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. Nat. Rev. Microbiol., 10:323–335.
- Krivan, H.C., Roberts, D.D. & Ginsburg, V. 1988. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc β1-4Gal found in some glycolipids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:6157–6161.
- Kitaoka, M., Tian, J. & Nishimoto, M. 2005. Novel putative galactose operon involving lacto-*N*-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. Appl. Environ. Microbiol., **71**:3158– 3162.
- Martens, E.C., Chiang, H.C. & Gordon, J.I. 2008. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. Cell Host Microbe, 4:447–457.
- Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R.J., Teixeira, M.M. & Mackay, C.R. 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. Nature, 461:1282–1286.

- Miwa, M., Horimoto, T., Kiyohara, M., Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H., Katayama, T. & Yamamoto, K. 2009. Two distinct α-L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. Glycobiology, **19**:1010–1017.
- Miwa, M., Horimoto, T., Kiyohara, M., Katayama, T., Kitaoka, M., Ashida, H. & Yamamoto, K. 2010. Cooperation of β -galactosidase and β -*N*-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. Glycobiology, **20**:1402–1409.
- Sakurama, H., Fushinobu, S., Hidaka, M., Yoshida, E., Honda, Y., Ashida, H., Kitaoka, M., Kumagai, H., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2012. 1,3-1,4-α-L-fucosynthase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. J. Biol. Chem., 287:16709–16719.
- Sakurama, H., Kiyohara, M., Wada, J., Honda, Y., Yamaguchi, M., Fukiya, S., Yokota, A., Ashida, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2013. Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of *Bifidobacterium longum* subspecies *longum* shows unique substrate specificity and requires a designated chaperone for its active expression. J. Biol. Chem., 288:25194– 25206.
- Sano, M., Hayakawa, K. & Kato, I. 1992. An enzyme releasing lacto-N-biose from oligosaccharides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:8512–8516.
- Schnaar, R.L., Suzuki, A. & Stanley, P. 2009. Glycosphingolipids. *In* Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Labortory Press, Cold Spring Harbor, New York, 129–141.
- Patterson, M.C. 2013. Gangliosidoses. Handb. Clin. Neurol., 113:1707–1708.
- Shevinsky, L.H., Knowles, B.B., Damjanov, I. & Solter, D. 1982. Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells. Cell, 30:697–705.
- Takahashi, Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131:861–872.
- Thomas, A.S. & Hughes, D.A. 2014. Fabry disease. Pediatr. Endocrinol. Rev., 12:88–101.
- Basu, I. & Mukhopadhyay, C. 2014. Insights into binding of cholera toxin to GM1 containing membrane. Langmuir, 30:15244–15252.
- Thomson, J.A. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, **282**:1145–1147.
- Wada, J., Ando, T., Kiyohara, M., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamaguchi, M., Kumagai, H., Katayama, T. & Yamamoto, K. 2008. *Bifidobacterium bifidum* lacto-*N*-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. Appl. Environ. Microbiol., 74:3996–4004.
- Wright, A.J. & Andrews, P.W. 2009. Surface marker antigens in the characterization of human embryonic stem cells. Stem Cell Res., 3:3–11.
- Yoshida-Moriguchi, T., Yu, L., Stalnaker, S.H., Davis, S., Kunz, S., Madson, M., Oldstone, M.B.A., Schachter, H., Wells, L. & Campbell, K.P. 2010. *O*-mannosyl phosphorylation of α-dystroglycan is required for laminin binding. Science, **327**:88–92.

高効率 1,2-α-L-fucosynthase の作出と 様々な複合糖質への H 抗原構造の導入

杉山 友太, 片山 高嶺, 栗原 新

石川県立大学生物資源環境学部寄付講座腸内細菌共生機構学 〒921-8836 石川県野々市市末松1-308

Generation of a highly efficient 1,2-α-L-fucosynthase and its use for introducing H-antigen structure into various glycoconjugates Yuta Sugiyama, Takane Katayama, Shin Kurihara

Host-Microbe Interaction Research Laboratory Faculty of Bioresources and Environmental Sciences Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

Fuc α 1-2Gal linkages, the so-called H-antigens, constitute histo-blood group antigens and are involved in various physiological and pathological events. Recent studies have revealed that the H-antigen-containing glycans play an important role in establishing symbiosis between gut microbes and the host. H-antigen-containing glycans can also mitigate gut microbiota dysbiosis. Therefore, development of a method for synthesizing H-antigen-containing sugars is desired as a research tool and for medicinal purposes. In this study, we succeeded in converting an inverting 1,2- α -L-fucosidase into a highly efficient 1,2- α -L-fucosynthase. The synthase specifically synthesized H type 1-, type 2-, type 3- and type 4-chain-containing sugars with yields of 57–75 % based on acceptor depletion. The synthase was also able to introduce Fuc residues into Lewis a/x antigens to produce Lewis b/y tetrasaccharides. Moreover, the enzyme was shown to introduce H-antigens into sugar chains of a glycoprotein (porcine gastric mucin), as revealed by lectin blotting and mass spectroscopy analysis. These results show that the synthase developed in this study could serve as an alternative to other H-antigen synthesis methods involving α -1,2-fucosyltransferases and retaining α -fucosidase.

Key words: H-antigen, glycosynthase, fucosidase

E-mail:

- 杉山友太(sugiyama.yuta.6s@kyoto-u.ac.jp)(現所属:京都大 学大学院農学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白 川追分町),
- 片山高嶺 (takane@lif.kyoto-u.ac.jp) (現所属:京都大学大学院 生命科学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白川追 分町),
- 栗原 新 (skurihara@waka.kindai.ac.jp) (現所属:近畿大学生 物理工学部 〒 649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930)

共同研究者

後藤愛那(京都大学生命科学研究科),

- 加藤紀彦 (京都大学生命科学研究科),
- 芦田 久 (近畿大学生物理工学部),
- 本多裕司(石川県立大学生物資源環境学部),
- 吉田永史奈(石川県立大学生物資源工学研究所),
- 北岡本光(農業·食品産業技術総合研究機構現新潟大学農学部),
- 熊谷英彦 (石川県立大学生物資源環境学部),

緒 言

H抗原は血液型抗原決定基を構成する構造の一つであ り、ガラクトース(Gal)にフコース(Fuc)がα-1,2 グリコシド結合した二糖構造(Fucα1-2Gal)を指す.H 抗原は糖タンパク質、糖脂質およびオリゴ糖といった複 合糖質の糖鎖の非還元末端に見られ(Hakomori, 1999)、 様々な生物学的プロセスで重要な役割を果たしている (Heimburg-Molinaro *et al.*, 2011; Tateno *et al.*, 2013).ヒ トにおいて、H抗原はα-1,2-フコシルトランスフェラー ゼ(FUT1およびFUT2)によって合成される(Mollicone *et al.*, 1994; Rouquier *et al.*, 1995).FUT1は赤血球およ び内皮細胞で発現して ABO 式血液型抗原のコア構造を 合成する一方、FUT2 は分泌器官で発現している(Su *et al.*, 2004).興味深いことに、マウスにおいて腸管の

山本憲二 (石川県立大学生物資源工学研究所)

Fut2の発現が腸内細菌によって亢進されることが報告 されている (Bry et al., 1996; Goto et al., 2014; Pickard et al., 2014). この現象は、宿主が特定の腸内細菌へH抗 原を栄養源の一つとして提供し、定着を促すシステムで あると考えられていたが (Bry et al., 1996), 最近, 腸 内細菌の1,2-α-L-フコシダーゼにより遊離したFucが腸 管出血性大腸菌の病原性遺伝子の発現を減弱させること が示された (Pacheco et al., 2012). また, Pham et al. (2014) はマウスにH抗原を構造に含むオリゴ糖を投 与することで, Enterococcus faecalis に対する感染抵抗性 が付与されることを示した. これらの結果は腸管におけ るH抗原構造が宿主の健康にとって重要であることを 示唆している. ヒトにおいては, 非分泌型個体(FUT2-/-) は分泌型個体と比較してクローン病やI型糖尿病のリス クが高いことが報告されている (McGovern et al., 2010; Smyth *et al.*, 2011).

H抗原構造を含む糖質は、母乳によっても腸内へ供給 される.人乳中で3番目に豊富な固形成分であるヒトミ ルクオリゴ糖(Human milk oligosaccharides, HMOs)は, 母親が分泌型である場合、ほとんどの非還元末端にH 抗原が見られる (Kunz et al., 2000: Kobata, 2010: Urashima et al., 2012). HMOs はヒト消化酵素による分 解を受けないため大部分が大腸に到達し(Brand-Miller et al., 1998), そこで腸内細菌 (ビフィズス菌など)の 選択的増殖を促すと考えられている(Kitaoka et al., 2005; Sela et al., 2008; Wada et al., 2008a; Sela et al., 2008; Asakuma et al., 2011; Sakurama et al., 2012; Sakurama et al., 2013; Lewis et al., 2015; Katayama, 2016). またH抗 原を有する HMOs は, Campylobacter jejuni の感染を防 ぐことが報告されている (Ruiz-Palacios et al., 2003). H 抗原を有する HMOs の1つである 2'-フコシルラクトー ス (2'-FL, Fucα1-2Galβ1-4Glc: Glc, グルコース) は, 腸 管上皮細胞のリポ多糖誘発性炎症反応を減弱させること が報告されている(He et al., 2016). これらの結果は, H抗原構造が腸内細菌と宿主間の良い共生関係を確立す るため、さらには様々な腸関連疾患を予防するために重 要であることを示唆している.これまでに、H抗原構造 の酵素合成はα-1,2-フコシルトランスフェラーゼまたは α-フコシダーゼによる糖転移反応を用いた例が報告され ている. Drouillard et al. (2006) は, Helicobacter pylori 由来のα-1,2-フコシルトランスフェラーゼを含むいくつ かの遺伝子を大腸菌へ導入し、2'-FLおよびラクト-N-フ コペンタオース IV (LNFP IV, Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Galβ1-4Glc: GlcNAc, N-アセチルグルコサミン)を合成 することに成功している. 組換え大腸菌を用いた 2'-FL のグラムスケールでの合成は Baumgärtner et al. (2013) によっても報告されている. Zhao et al. (2016) は、Fuc とラクト-*N*-テトラオース(LNT, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)より, *Thermosynechococcus elongates*由来 α -1,2-フコシルトランスフェラーゼおよびフコキナーゼ /GDP-Fuc ピロホスホリラーゼを利用したワンポット酵 素反応系を用いて1gのラクト-*N*-フコペンタオース I (LNFP I, Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) を 合 成した. このようにグリコシルトランスフェラーゼは, 特定のオリゴ糖を合成するための有用なツールであると いえる. Osanjo *et al.* (2007) は *Thermotoga maritima* 由 来の α -L-フコシダーゼ (アノマー反転型) 変異体が, 4-ニトロフェニル(*p*NP)- α -L-フコシドから Gal β -*p*NPへ Fuc を転移可能であることを報告している.

グリコシンターゼとは、グリコシダーゼに変異を導入 することで、フッ化糖を種々の糖アクセプターへ転移さ せることができるようになった酵素を指す.グリコシン ターゼでは加水分解活性が欠失しているため、形成され たグリコシド結合は、加水分解を免れる(Shaikh & Withers, 2008).グリコシンターゼは、Hehre *et al.* (1979)による発見に基づいて開発され、最初にアノマー 保持型のグリコシダーゼに適用された(Malet & Planas, 1998; Mackenzie *et al.*, 1998).また最近、アノマー反転 型のグリコシダーゼにも適用されている(Honda & Kitaoka, 2006; Wada *et al.*, 2008b; Ohnuma *et al.*, 2012).

我々は以前, *Bifidobacterium bifidum* JCM 1254 由来の アノマー反転型 1,2-α-L-フコシダーゼ(*Bb*AfcA)のフ コシンターゼ化(1,2-α-L-フコシンターゼ)に成功した が,作出した酵素の反応効率は低かった(Wada *et al.*, 2008b). *Bb*AfcAは1型,2型および3型H抗原を含有 するオリゴ糖および糖タンパク質糖鎖に対し高いフコシ ダーゼ活性と特異性を有することから(Katayama *et al.*, 2004; Gotoh *et al.*, 2015),より高いシンターゼ活性を有 する変異体が作出できれば、オリゴ糖合成に有用である と考えられた.

BbAfcAの活性中心は、アスパラギン酸残基(D766) によって活性化されたアスパラギン残基(N423)が塩 基触媒として作用するというユニークな反応機構を有し ている(Nagae et al., 2007; Liu et al., 2013)(Fig.1). 求核攻撃する水分子は、2つのアスパラギン残基(N421 およびN423)によって支持されており、N421はE566 のグルタミン酸残基(一般酸触媒)とも水素結合して E566 側鎖をグリコシド酸素に対し適切に配向させてい る.本研究において、我々はBbAfcAへの変異導入によ るフコシンターゼ反応効率の向上を目指した.次いで、 単糖、オリゴ糖、および糖タンパク質を用いて反応の特 異性を解析した.



Fig. 1. Structure of the catalytic site of $1,2-\alpha$ -L-fucosidase from *B. bifidum*.

The catalytic four residues (N421, N423, E566, and D766) and Gal-recognizing residues (H419, E485, W500, and E566) are shown with the attacking water molecule depicted by a sphere (PDB ID: 2EAC) (Nagae *et al.* 2007). 2¹-FL observed in the crystal structure of E566A mutant (PDB ID: 2EAD) is used to model the complex structure with WT enzyme. The hydrogen bonds are shown as dashed line. This figure is modified from Figure 1 of Sugiyama *et al.* (2016).

実験方法

BbAfcA 変異体の作製

BbAfcA 触媒ドメイン遺伝子を保有する pET23b-afcA (Katayama et al., 2004) を鋳型として,QuikChange site-directed mutagenesis (Stratagene)を用いて触媒残 基ヘアミノ酸置換を導入した.シーケンス解析を行い, 目的以外の変異が無いことを確認した後,得られたプラ スミドを大腸菌 BL21 $\Delta lacZ$ (DE3) (Ashida et al., 2009) へ導入した.

組換え BbAfcA 変異体の発現と精製

His-tag を利用して Ni-NTA スピンカラム (QIAGEN) を用いた酵素精製を行い, Slide-A Lyzer G2 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 10mM Tris-HCl 緩 衝 液 (pH 8.0) に対して透析した. 必要であれば, MonoQ 5/50 カラム (GE Healthcare Life Science)を用いてさ らに精製した. 精製度は SDS- PAGE により確認した. タンパク 質 濃度 は, 280 nm でのモル吸光係数 (184,165 M^{-1} cm⁻¹)より算出した.

組換え BbAfcA 変異体の加水分解活性測定

2'-FL (1mM) を用いて *Bb*AfcA 変異体の加水分解活 性を測定した.野生型は 0.51 nM, *Bb*AfcA^{N421D} は 1.0 nM, *Bb*AfcA^{N423D} は 10.2 nM, *Bb*AfcA^{N423Q} は 51 nM, その他の 変異体は 102 nM で使用した. 遊離した Fuc は, Fucose dehydrogenase (Kikkoman) と Thio-NAD (Oriental Yeast) を用いた方法で定量した (Katayama *et al.*, 2004).

組換え BbAfcA 変異体のフコシンターゼ活性測定

β-フッ化フコース (β-FucF) とラクトース (Lac) を 用いて *Bb*AfcA 変異体のフコシンターゼ活性を調べた. 10mM の基質と 4 μ M の *Bb*AfcA 変異体を含む 100mM ク エン酸緩衝液 (pH 5.0) を 30℃で 30 分間インキュベー ト後,95℃で 3 分間処理して反応を停止させた.反応物 は Asahipak NH2P-50 4E (4.6×250mm) カラム (Showa Denko)を用いて,高速液体クロマトグラフィー(HPLC) (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific) 分析 した. カラムオーブンは 40℃とし,溶出は 73%アセトニトリ ルを使用し,1.0mL/min で行った.検出はコロナ荷電 化粒子検出器 (CAD, Thermo Fisher Scientific) を用い て行った.2'-FL量は,標品から作成した検量線から算 出した.

反応の至適pHは、100mMクエン酸緩衝液(pH4.5-6.0), 2-モルホリノエタンスルホン酸緩衝液(pH6.0-7.0) および3-モルホリノプロパンスルホン酸緩衝液(pH7.0-8.0)を用いて決定した. 熱安定性は100mMクエン酸 緩 衝 液 (*BbAfcA^{N423H}*は pH5.5, *BbAfcA^{N423D/D766N}*は pH5.0)中で30分間インキュベートを行って評価した.

アクセプターの特異性解析

単糖とオリゴ糖を用いて *Bb*AfcA^{N423H}のアクセプター 特異性を調べた. 10μ Mの *Bb*AfcA^{N423H}, 10mM β-FucF と 10mM アクセプターを含む 100mM クエン酸緩衝液 (pH5.5)を 30℃で 30分インキュベートし、95℃で 3 分間処理後、反応液を HPLC-CAD を用いて分析した. 反応効率はアクセプター消費量を算出して評価した. HPLC-CAD 分析は、HILICpak VG-50 4E カラム(4.6× 250mm, Showa Denko)を用いて行い、カラムオーブン は 40℃とした.溶出は 73% アセトニトリルを使用し 1.0mL/min で行った.キシロビオースをアクセプター として使用した場合は、移動相としてアセトニトリル/ メタノール/水(75/20/5)を使用した.

ブタ胃ムチン(porcine gastric mucin, PGM)もアク セプターとして用いた.なお、フコシンターゼ反応の前 に Fuc 残基を PGM の糖鎖から除去した.脱フコシル化 は、2mg/mL PGM、1mM ジチオトレイトールおよび 10 μ M の野生型 *Bb*AfcA を含有する 50mM リン酸ナトリ ウム緩衝液 (pH6.5) を 30℃で 48 時間インキュベート し行った.反応を95℃で停止させた後、反応液を水に 対して透析、凍結乾燥し脱フコシル化 PGM を調製した. 1mg/mL 脱フコシル化PGM. 10mM B-FucF および 10µM BbAfcA^{N423H}を含有する 50mM クエン酸緩衝液 (pH5.5) を 30 ℃ で 30 分間インキュベートした後, サ ンプルをメタノール処理した Immobilon-P 膜(Millipore) 上にスポットした. 2% (w/v) ウシ血清アルブミンを 含む 0.05% (v/v) Tween-20 ブロッキング剤含有トリス 緩衝食塩水中(TBS-T)でブロッキング後、ビオチン結 合レクチン [Ulex europeus agglutinin I (UEA-I) および ピーナッツ agglutinin (PNA)] (0.4µg/mL) およびペル オキシダーゼ結合ストレプトアビジン(0.125µg/mL)を 含む TBS-T 中で室温 60 分間インキュベートした. TBS-T で洗浄後, SuperSignalTM West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fischer Scientific) と LAS-3000 (Fujifilm)を使用して結合を検出した.

0-結合型糖鎖の調製

O-結合型糖鎖は還元的β-脱離によって得た(Aoki et al., 2008). 凍結乾燥した糖タンパク質(100 μ g)を1M の水素化ホウ素ナトリウムを含有する500 μ Lの100mM 水酸化ナトリウムに再懸濁し,ガラス管中で45℃で18 時間インキュベートした. その後,氷上で10%(v/v) 酢酸で中和し,Dowex-50W-X8(H+型,100-200メッシュ, Sigma-Aldrich)カラムで脱塩した.オリゴ糖アルジトー ルを5%(v/v)酢酸で溶出して回収し,凍結乾燥した. 0.3mLの10%酢酸含有メタノールを添加し,40℃で窒 素雰囲気下で乾燥させることでホウ酸をメタノールと共 沸させ除去した.この工程を5回繰り返した.試料を 0.3mLの5%酢酸で再溶解し,予め平衡化したSep-pak C18カートリッジ(Waters)に添加した.フロースルー および2mLの5%酢酸洗浄画分をオリゴ糖アルジトー ル画分として回収し,凍結乾燥した.

糖鎖およびオリゴ糖の完全メチル化

糖鎖の完全メチル化は、Anumula & Taylor (1992)の 方法に従った. 凍結乾燥オリゴ糖および O-結合型糖鎖 由来オリゴ糖アルジトールを 200µLの無水ジメチルス ルホキシド (DMSO) で再溶解した. 試料を 250µLの 塩基 (水酸化ナトリウム含有 DMSO) および 150µLの ヨードメタンと5分間激しく混合することにより、メチ ル化を行った. 2mLの5%酢酸および2mLのジクロロ メタンを添加した後、完全メチル化サンプルを有機溶媒 層に抽出し、次いでこれを窒素雰囲気下 40℃で乾燥さ せた. サンプルを予め平衡化した Sep-pak C18 カート リッジに添加. 水で洗浄, 85% (v/v) アセトニトリル で溶出した.溶出画分を窒素流下,40℃で再度乾燥した.

反応産物の精製

フコシンターゼ反応により生成したオリゴ糖を精製した.反応液(750~4300 μ L)をAmberlite MB-3 で脱塩し, 凍結乾燥後,Sugar-Dカラム(20×250mm, Nacalai Tesque)に供した.カラムオーブンは40℃で,溶出は 72%アセトニトリルで5.0mL/minで行い,示差屈折率 検出器(RID-10A, Shimadzu)によりモニターした. 反応産物を含む画分を合一し,凍結乾燥後,さらに TSK-gel 80Ts(20×250mm, Tosoh)カラムを用いて 精製した.溶出は水で7.0mL/minの流速で行い, RID-10Aでモニターした.

マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質 量分析(MALDI-TOF MS)および MALDI-TOF/TOF MS 解析

マトリックスとして 2,5-ジヒドロキシ安息香酸を用い, ポジティブイオンモードで行った. MALDI-TOF/TOF MS 解析(Bruker UltrafeXtreme, Bruker Daltonics)に より, MS/MS スペクトルを得て, 糖鎖構造の推定を行っ た. 糖鎖の理論質量は, GlycoWorkbench 2.0(Ceroni *et al.*, 2008)を用いて算出した. 糖鎖量の半定量的な推定 は, 全シグナル強度を 100%とすることで行った.

結 果

高効率 1,2-α-L-フコシンターゼの選抜

BbAfcAの活性中心は、N421、N423、E566および D766により構成される (Fig.1). E566はフコシンター ゼ反応において塩基触媒として必須であると考え, N421, N423 および D766 にアミノ酸置換を導入した. 2'-FL加水分解活性を測定したところ, BbAfcA^{N421D}, BbAfcA^{N423D} および BbAfcA^{D766E} は野生型 BbAfcAの 36%. 4.9% および 25% の活性を保持していた (Sugiyama et al., 2016)が、他の変異体では劇的に減少していた.こ れらの変異体のうち, BbAfcA^{N423H}が, β-FucFとLacを 基質とした際に最も高いフコシンターゼ活性を示した (Sugiyama *et al.*, 2016). *Bb*AfcA^{N423D}のフコシンターゼ 活性は、以前報告した BbAfcAD766G と同等であった (Wada et al., 2008b).次に、N423DまたはN423H変異をバッ クグラウンドにして D766 変異体を作出した (Sugiyama et al., 2016). N423D における D766N 変異はフコシン ターゼ活性の劇的な増加をもたらした一方, N423Hに おける D766 へのアミノ酸置換の導入は活性の減少をも たらした (Sugiyama et al., 2016). この結果から, *Bb*AfcA^{N423H} および *Bb*AfcA^{N423D/D766N} をさらなる分析に用
いることとした.

*Bb*AfcA^{N423H}は pH 5.5 で. *Bb*AfcA^{N423D/D766N} は pH 5.0 で 最も高い活性を示し, その活性は以前の研究で得られた BbAfcA^{D766G}よりも大幅に高かった(Fig.2A)(Wada et al., 2008b). BbAfcA^{N423H}および BbAfcA^{N423D/D766N}のいず れの場合も、反応は30分以内に定常に達した。生成物 濃度(2'-FL)と酵素濃度との比例関係は反応の初期段 階(<3分)でのみ観察されたが(Fig.2A),これは水 溶液中でのβ-FucFの半減期が短い(20分)ためである と考えられた (Sakurama et al., 2012). 添加した B-FucFおよびLacに対する収率は、いずれの基質濃度 においても、 $BbAfcA^{N423D/D766N}$ (83~94%) よりも BbAfcA^{N423H}の方が(88~100%)わずかに高かった. また. *Bb*AfcA^{N423D/D766N}は*Bb*AfcA^{N423H}と比較して. Lac 濃度に対する影響を受けやすく、100mM Lac 存在下で の 収率 は、*BbAfcA^{N423D/D766N}* で 60%、*BbAfcA^{N423H}* は 80%であった (Sugiyama *et al.*, 2016). *Bb*AfcA^{N423H} は 55℃ 30 分のインキュベーション後でも 90%の活性を維 持したが. BbAfcA^{N423D/D766N}は40℃30分のインキュベー ションで失活した.これらの結果より, BbAfcA^{N423H}が最 も効率的な1.2-α-L-フコシンターゼであると考えられた.

*Bb*AfcA^{N423H}のアクセプター特異性

*Bb*AfcA^{N423H}のアクセプター特異性を,10mMの種々 の単糖およびオリゴ糖を用いて解析した(Table 1).12 種の単糖の中で,Galが最も効率的に消費され(83%), HPAEC-PAD 解析において生成物と予想されるピークが 認められた(Sugiyama *et al.*, 2016).L-アラビノース (L-Ara)は48%が消費され、良いアクセプターであった. グルコース (Glc) とキシロース (Xyl) はそれぞれ 8.4% と 7.2%がフコシンターゼ反応で消費され, HPAEC-PAD 分析で小さなピークが検出された (Sugiyama *et al.*, 2016). L-ラムノース (L-Rha) はわずかに消費された (Table 1). これらの反応におけるアクセプター特異性 については考察で述べる. また, L-Fuc, フルクトース (Fru), ガラクトサミン, *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc), グルコサミン, GlcNAc およびマンノース はいずれもアクセプターとして機能しなかった.

3-β-ガラクトビオース, Lac および 6-β-ガラクトビオー スは、二糖の中で最も効率的に(>85%)フコシル化さ れた(Table 1). また、メリビオース、ガラクト-N-ビオー ス (GNB, Galβ1-3GalNAc), 3-β-ガラクトシルグルコー ス. ラクト-N-ビオースI (LNB, Gal β 1-3GlcNAc). 4- β -ガラクトビオース、ラクチュロース、N-アセチルラク トサミンもアクセプターとして認識され、45~79%の 基質が消費された (Table 1, Fig.3A). マルトース, イ ソマルトース、セロビオース及びゲンチオビオースは弱 いアクセプター(2.6~22%)として機能したが、トレ ハロース、ラミナリビオース及びスクロースはアクセプ ターとして機能しなかった.一方で、キシロビオース (Xylβ1-4Xyl)を使用した際に33%が消費され、反応産 物と予想される新しいピークが出現した(Table 1およ び Fig.3B). フコシル化キシロビオースの化学構造は機 器分析により決定した(後述).

3-フコシルラクトース (3-FL, Galβ1-4 (Fucα1-3) Glc) をアクセプターとした際の反応効率は82%であり, ラ クトジフコテトラオース (LDFT, Fucα1-2Galβ1-4 (Fucα1-3) Glc) 標品と同じ保持時間のピークが HPLC



(A) *Bb*AfcA^{N423H}

(B) BbAfcAN423D/D766N

Fig. 2. Time course of the fucosynthase reaction catalyzed by *Bb*AfcA^{N423H} and *Bb*AfcA^{N423D/D766N} mutants. The reaction was carried out at 30 °C in the presence of 10 mM β-FucF, and Lac, and the samples were taken at the indicated time points for HPLC analysis. *Bb*AfcA^{N423H} (A) and *Bb*AfcA^{N423D/D766N} (B) were added at the concentrations between 0.25 and 1 mg/mL. This figure is modified from Figure 2 of Sugiyama *et al.* (2016).

	Acceptor	Product	(707 JE 1- 22
Sugar	Structure	Deduced ^{<i>a</i>} or determined ^{<i>b</i>} str	vieta" (%) ucture
Monosaccharides			
L-Arabinose		$Fucal-2Ara^{a}$	48
L-Fucose			0
Fructose			0
Galactose		$Fuc\alpha 1-2Gal^{a}$	83
Galactosamine			0
<i>N</i> -Acetylgalactosamine			0
Glucose		$Fucal-3Glc^{a}$	8.4
Glucosamine			0
<i>N</i> -Acetylglucosamine			0
Mannose			0
L-Rhamnose		$Fuc\alpha 1-4Rha^{a}$	2.3
Xylose		Fuc α 1-3Xyl ^a	7.2
Disaccharides			
Trehalose	Glca1-1aGlc		0
Sucrose	Glca1-2BFru		0
Maltose	Glca1-4Glc	$Glca1-4(Fuca1-3)Glc^a$	2.6
Isomaltose	Glca1-6Glc	$Glca1-6(Fuca1-3)Glc^{a}$	22
Laminaribiose	Glcß1-3Glc		0
Cellobiose	Glcß1-4Glc	$Glc\beta1-4(Fuc\alpha1-3)Glc^{a}$	5.6
Gentiobiose	Glcß1-6Glc	$Glc\beta1-6(Fuc\alpha1-3)Glc^{a}$	22
Melibiose	Galα1-6Glc	Fuca1-2Gala1-6Glc ^a	45
3-B-Galactobiose	Galß1-3Gal	Fucα1-2Galβ1-3Gal ^a	86
			Continued on the next page.

 TABLE 1.
 Acceptor specificity of 1,2-0-1-fucosynthase (BbAfcA N423H mutant).

杉山 友太, 片山 高嶺, 栗原 新

			Continued.
	Accentor	Product	— Yield ^e (%)
Name	Structure	Deduced ^a or determined ^b structure	(0/) 51511
Galacto-N-biose	GalB1-3GalNAc	Fuc α 1-2GalB1-3GalNAc ^b	57
3-B-Galactosylglucose	Galß1-3Glc	Fuc α 1-2Gal β 1-3Glc ^a	79
Lacto-N-biose I	GalB1-3GlcNAc	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc ^a	68
4-B-Galactobiose	GalB1-4Gal	$Fuc\alpha 1-2Gal \beta 1-4Gal^a$	63
Lactulose	Galß1-4Fru	Fuc α 1-2Gal β 1-4Fru ^a	72
Lactose	Galß1-4Glc	Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc ^b	86
N-Acetyllactosamine	GalB1-4GlcNAc	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc ^a	67
6-B-Galactobiose	Galß1-6Gal	Fuc α 1-2 Gal β 1-6Gal ^a	85
Xylobiose	Xylß1-4Xyl	Xvl β 1-4(Fuc α 1-3)Xvl ^b	33
Tri-saccharides			
3-FL	Galß1-4(Fucα1-3)Glc	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc ^a	82
Lewis a trisaccharide	Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc	Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc ^{<i>a</i>}	43
Lewis x trisaccharide	GalB1-4(Fucα1-3)GlcNAc	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc ^{<i>a</i>}	62
Tetrasaccharides			
Lacto-N-tetraose	GalB1-3GlcNAcB1-3GalB1-4Glc	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc ^b	75
Lacto-N-neotetraose	GalB1-4GlcNAcB1-3GalB1-4Glc	Fuca1-2GalB1-4GlcNAcB1-3GalB1-4Glc ^b	59
^{<i>a</i>} ; The linkages were deduced t	based on Fig. 5.		

- 145 -

Table 1 continued

^b; The structures were determined by NMR and MS analysis.

^c; Yield was deduced from the consumed amount of the acceptor.

Assays were performed in duplicate or in triplicate and the data for a representative experiment are shown.

The table is modified from Supplementary table S2 of Sugiyama et al. (2016).

分析で認められた. ルイス a 及びルイス x 三糖からルイ ス b 及びルイス y 四糖が 43%及び 62%の効率で生成し ていた(Table 1; Sugiyama *et al.*, 2016). アクセプター としてラクト-*N*-テトラオース(LNT, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)を用いるとラクト-*N*-フコペンタオース I に対応するピークが現れ,反応効率は 75%であった (Table 1 および Fig.3C). ラクト-*N*-ネオテトラオース (LN*n*T, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)をアクセプター とした際の反応効率は 59%であった(Table 1 および Fig.3D). これらの生成物の構造については後述する.

機器分析によるフコシンターゼ反応産物の解析

フコシンターゼ反応のアクセプター特異性を決定する ために、GNB、キシロビオース、LNTおよびLNnTを アクセプターとした反応液より精製した反応産物の構造 を MALDI-TOF-MS 及び NMR により解析した. キシロ ビオースをアクセプターとした際に得られた反応産物の 1次元および2次元NMRスペクトル解析結果よりFuc はキシロビオースの還元末端 Xyl 残基の O3 位置に導入 され、3-フコシルキシロビオース (Xylβ1-4 (Fucα1-3) Xyl)を生成することが示された. GNB, LNTおよび LNnTをアクセプターとして用いた時, Fuc は α -1,2 結 合を介して非還元末端のGal 残基に結合し、それぞれ 2'-フコシル GNB (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc), LNFP I (Fuc α1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc,1型H抗原)及び LNFP IV (Fuca1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc, 2 型 H抗原)を形成することが示された. 2'-フコシル GNB 中の GalNAc 残基はピラノース形とフラノース形で存在 していた (Angyal & Pickles, 1972). 精製産物の量とそ の回収率は、2'-フコシル GNB は 11.4 mg で 50 % mol, 3-フコシルキシロビオースでは 0.4 mg で 4 % mol, LNFP I は 2.0 mg で 30 % mol, LNFP IV は 2.7 mg で 41 % mol であった.

糖タンパク質糖鎖へのH抗原導入

モデルタンパク質としてブタ胃ムチン (PGM)を使用 した. Fig. 4AにUEA-Iおよび PNAを用いたレクチンブロッ トにより, H抗原 (左) および T抗原 (Gal β 1-3GalNAc, 右)を検出した結果を示した.野生型 *Bb*AfcAによる PGM 処理は UEA-I シグナルの消失をもたらし (レーン 1および2),同時に PNA シグナルを増加させたことか ら (レーン5および6),Fuc が除去されてT抗原が現 れたことが示された.脱フコシル化した PGM を β -FucF と共にインキュベートすると,UEA-I シグナルが現れた (レーン3)が,*Bb*AfcA^{N423H} 非存在下では UEA-I シグナ ルは認められなかった (レーン4).PNA シグナルはわ ずかに減弱していた (レーン6~8).

次いで、O-型糖鎖をタンパク質から遊離し、完全メチ ル化後、MALDI-TOF MS および MALDI-TOF/TOF-MS により解析した(Fig.4B; Sugiyama *et al.*, 2016). ピー クの相対含有量を、全シグナル強度に対する百分率で表 した(Sugiyama *et al.*, 2016). 野生型 *Bb*AfcA による PGM 処理は、*m/z* 708.4(推定 Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAcitol)の相対量を減少させ、*m/z* 534.3(推定 Gal β 1-3Gal-NAc-itol)の相対量を増加させた(Fig.4B; Sugiyama *et al.*, 2016). フコシンターゼ反応後、デオキシへキソー





The reactions were carried out at 30 °C for 30 min in 100 mM sodium citrate buffer (pH 5.5) containing β -FucF (10 mM), acceptors (10 mM) and 10 μ M *Bb*AfcA^{N423H}. The mixtures were analyzed by HPLC-CAD. The chromatograms obtained for galacto-*N*-biose (GNB) (A), xylobiose (Xyl-Xyl) (B), lacto-*N*-tetraose (LNT) (C), and lacto-*N*-neotetraose (LNnT) as acceptors (D) are shown. The peaks of acceptor and product are indicated. This figure is modified from Figure 3 of Sugiyama *et al.* (2016).



(A) Lectin blot

(B) MALDI-TOF MS



Fig. 4. Analysis of the reaction products using porcine gastric mucin (PGM) as an acceptor.
(A) Lectin blot analysis of non-treated PGM (lane 1 and 5), 1,2-α-L-fucosidase (*Bb*AfcA^{WT})-treated PGM (lane 2 and 6), defucosylated PGM incubated with β-FucF in the presence of *Bb*AfcA^{N423H} (lane 3 and 7) and in the absence of enzyme (lane 4 and 8). The samples were spotted with varying amounts (0.125 to 1.0µg), and the membrane was blotted with UEA-I and PNA for detecting H- and T-antigens, respectively. (B) MALDI-TOF MS analysis of permethylated *O*-glycan alditols. *O*-Glycans released from non-treated PGM (upper panel), *Bb*AfcA^{WT}-treated PGM (middle panel), and *Bb*AfcA^{WT}- and *Bb*AfcA^{N423H}-treated PGM (*Bb*AfcA^{WT} + *Bb*AfcA^{N423H}) (lower panel) were used for the analysis. This figure is modified from Figure 4 of Sugiyama *et al.* (2016).

ス (dHex, Fuc は dHex) 含有糖鎖の相対量 (m/z=708.4) は. 未処理 PGM と同等レベルまで回復した (Fig.4B; Sugiyama et al., 2016). 同様に、m/zが1157.7 (dHex-1Hex2HexNAc2-itol: Hex. ヘキソース: HexNAc. N-アセ チルヘキソース)および1331.8 (dHex2Hex2HexNAc2itol) 相対量は, PGM を野生型 BbAfcA で処理すると減 少し, 同時にdHexを含まない糖鎖 (*m/z*=983.6, Hex2HexNAc-itol) 含有量が増加した (Fig.4B; Sugiyama et al., 2016). フコシンターゼ反応後, Hex2HexNAc2-itol (m/z=983.6)の相対量は減少する 一方で、dHex 含有糖鎖(*m/z*=1157.7 および1331.8) の含有量は増加した.同様の傾向は,m/z 1228.7 (Hex2HexNAc3-itol) と 1402.8 (dHex1Hex2HexNAc3itol) および1576.9(dHex2Hex2HexNAc3-itol)間. さ らにm/z 2127.2 (Hex4HexNAc5-itol) と 2475.4 (dHex 2Hex4HexNAc5-itol) 間でも認められた(Fig.4B; Sugiyama et al., 2016). 一方で、還元末端に HexNAc 残 基を有すると思われる m/z 1269.8 の 糖鎖は (GlcNAc β1-3Galβ1-3/4GlcNAcβ1-6GalNAc-itolと推定)(Karlsson et al., 1997), 野生型 BbAfcA および BbAfcA^{N423H} 処理の 影響が認められなかった(Fig. 4B: Sugivama et al., 2016).

考 察

以前の研究で取得した BbAfcAD766G のフコシンターゼ 活性は非常に弱かったため(収率6%未満)(Wada et al., 2008b), 生成物の精製は困難であったが、本研究で は高効率変異体 BbAfcA^{N423H}を作出することが出来たた め、アクセプター特異性を詳細に調べることが可能と なった. BbAfcA^{N423H}は, Gal および非還元末端に Gal を 含有するオリゴ糖に加え、単糖ではL-Ara、Glc、L-Rha および Xyl, さらに二糖類のマルトース, イソマルトー ス. セロビオース. ゲンチオビオースとキシロビオース をアクセプターとして認識した(Table 1 および Fig.5). L-Araの場合, ⁴C₁ピラノース型においてO4がアキシャ ル 配 座 を と る た め に (Angyal & Pickles, 1972), *Bb*AfcA^{N423H} が認識可能であると予想された(Table 1 お よびFig.5). L-Rhaの場合, 糖の¹C,環を反転させると C2- (axial), C3- (equatorial), C4- (equatorial) -OH 基が Gal の C4-, C3-, C2 - OH と重なることになる. そ のため、生成物はFuca1-4Rhaと考えられる(Fig.5お よび Table 1).

β-FucFとキシロビオースから生じた生成物は、3-フ



Fig. 5. Structural requirement of acceptor sugars for $1,2-\alpha$ -L-fucosynthase reaction.

Structures of H-antigen, L-arabinopyranose (L-Ara), L-rhamnose (L-Rha), α-anomer of 3-fucosyllactose, and α-anomer of 3-fucosylxylobiose are shown. The acceptor sugar accommodated in the (-1) subsite of the enzyme is shown by dashed line. This figure is modified from Figure 5 of Sugiyama *et al.* (2016). コシルオキシビオース (Xylβ1-4 (Fucα1-3) Xyl) であっ た (Sugivama et al., 2016). この結果は、Xvl またはGlc のα-アノマー酸素を認識していることを強く示唆して いる (Fig.5). キシロビオースの還元末端α-アノマー O1 (axial), O2 (equatorial) およびO3 (equatorial) は, GalのO4(axial), O3(equatorial) およびO2(equatorial) に構造的に対応している。ラミナリビオースのような3 位にグリコシド結合を有する二糖は、還元末端 Glcの 03がフリーではないため、アクセプターにならなかっ たと考えられる. α-GalNAc および α-GlcNAc の C3 ヒド ロキシル基は equatorial であるが、BbAfcA^{N423H}は認識し なかった. このことから、1,2-α-L-フコシンターゼが認 識するアクセプターの構造要素は、2つの連続した equatorial OH に続いた axial OH を1つ有する椅子型配 座を有する6員環であると推定された(Fig.5). これは、 BbAfcA 結晶構造から推察される Gal 認識様式に良く一 致しており (Nagae et al., 2007), また BbAfcA が LNFP II (Galβ1-4 (Fuca1-3) GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc) に対して は加水分解活性を示さず、3-FL (Gal
ß1-4 (Fuca1-3) Glc) およびLNFP V (Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4 (Fucα1-3) Glc) 中のα-(1-3)-フコシル結合に対してわずかな加水 分解活性を示すこととよく一致する(Fig.5)(Katayama et al., 2004). 興味深いことに, Lac では Gal 残基の C6-OH 基が Glc 残基の C3 の OH に近接して存在してお り、これは3-FLへの酵素の接近を妨げると予想される. セロビオース (Glcβ1-4Glc) (5.6%) とキシロビオース (33%)の間に見られる明確な反応効率の差は、非還元 末端糖から延長してくるヒドロキシメチル基によって引 き起こされたと予想される.

GNB, LNT および LNnT をアクセプターとして使用 した場合, *Bb*AfcA^{N423H}はα-1,2 結合を介して非還元末端 Gal 残基に Fuc 残基を特異的に導入していた(Sugiyama *et al.*, 2016). その他の Gal 含有糖から生じた産物の化 学構造は決定しなかったが,おそらくすべて H抗原構 造であろう. 従って,フコシンターゼ反応は本質的には 非還元末端 Gal で生じると考えられる. アクセプターと してメリビオース, 3-β-ガラクトビオース, 3-β-ガラク トシルグルコース, 4-β-ガラクトビオースおよび 6-β-ガ ラクトビオースとした反応液の HPLC プロファイルにお いては,副産物ピークは全く認められなかった.

MS分析および UEA-Iを用いたレクチンブロッティン グによって明らかとなったように,野生型 BbAfcA と BbAfcA^{N423H}で処理した PGM(脱フコシル化後に再度フ コシル化)のH抗原構造は,未処理 PGMに匹敵するほ どであった.野生型 BbAfcA と BbAfcA^{N423H}で処理した PGM で見られ,未処理 PGM では見られなかった PNA によるT抗原の検出は,おそらく還元剤(ジチオトレイ トール)の存在下での試料調製中の煮沸の繰り返しによ る糖タンパク質の変性から生じたと考えらえる.つまり, レクチンは PGM 糖鎖に対してより容易にアクセス出来 たことで生じたシグナルと思われる.高密度に糖鎖を有 するタンパク質 PGM に対する効率的な Fuc 導入は,本 手法が,糖脂質や細胞表面の糖鎖を含む様々な複合糖質 に障害を与えずに H 抗原を導入するツールとして使用 可能であることを示唆している.

Hehre *et al.* (1979) は、アノマー反転型 β-アミラーゼ がβ-マルトシルフルオリドを2段階でβ-マルトースと フッ化水素に加水分解することを見出した.後に Hehre-resynthesis hydrolysis と命名された反応は、アノ マー反転型酵素をグリコシンターゼに変換するための前 提条件である (Honda & Kitaoka, 2006; Wada et al., 2008b). すなわち、導入されたアミノ酸置換がフッ化 糖からのフッ素イオン遊離活性を保持しつつ. 加水分解 活性を大幅に減少させる場合に効率的なグリコシンター ゼ変異体が得られる(Honda & Kitaoka, 2006; Hidaka et al., 2010). 酸および塩基触媒として一対のカルボン酸 残基および求核水を保持する一般的なアノマー反転型酵 素の場合、塩基残基が保存されていれば、単に求核水を 保持する残基を中性のアミノ酸残基で置き換えること で、グリコシンターゼ化が起こり得る. 例えば. GH8 に属する還元末端キシロース遊離エキソ-オリゴキシラ ナーゼ (Honda & Kitaoka, 2006) および GH19 に属す るキチナーゼ (Ohnuma et al., 2012) が挙げられる. し かしながら、いくつかのアノマー反転型酵素は独特な反 応機構を有しており(Helland et al., 2009: Honda et al., 2016), それらをグリコシンターゼ化するための理論は 存在していない (Honda & Kitaoka, 2006; Wada et al., 2008b). 本研究で使用した BbAfcA は、前述の通り独特 な反応メカニズムを有している (Fig.1). 解析した51 種の BbAfcA 変異体のうち、2種の変異体 BbAfcA^{N423H} お よび BbAfcA^{N423D/D766N} は高いフコシンターゼ活性を示し たが、 求核水を保持する残基の変異体 (N421 変異体) はフコシンターゼ活性を示さなかった. BbAfcA^{N423H}お よび BbAfcA^{N423D/D766N}のフッ素遊離活性が何に由来する かは不明である.独特の反応機構を有するアノマー反転 型酵素から効率的なグリコシンターゼを創製するために は、経験的なアプローチが必要であると考えられる.

本研究ではβ-FucFの不安定さのために速度論的パラ メーターを求めることが出来なかった.しかし, *Bb*AfcA^{N423H}によって触媒される反応が最初の3分間で直 線的に進行したと仮定すると(Fig.2A),H抗原合成に 対する変異体の比活性は5s⁻¹であると推定され,この値 はα-1,2-フコシルトランスフェラーゼの値(1-20min⁻¹) よりもかなり高い.*Bb*AfcA^{N423H}を用いてH抗原含有糖 質の合成をスケールアップするためには, β-FucFの フィーディングまたは低温反応(<4℃)が必要である かもしれない.

本研究で開発された1,2-α-L-フコシンターゼ BbAfcA^{N423H}は、1型、2型、3型および4型H抗原、ル イスbおよびy抗原、および他の非天然型オリゴ糖を合 成した.また、糖タンパク質糖鎖にH抗原を導入可能 であることが示された.本酵素は糖鎖生物学の分野にお いて有用なツールであるといえる.

要 約

H抗原(Fucα1-2Gal)は、種々の生理現象に関与しているが、最近の研究において腸内細菌と宿主との間の 共生を確立するのに重要な役割を果たすことが明らかに された.したがって、H抗原含有糖を合成する方法の開 発が望まれている.本研究では、アノマー反転型 1,2-α-L-フコシダーゼを高効率の1,2-α-L-フコシンター ゼに変換することに成功した.作出した1,2-α-L-フコシ ンターゼは種々のオリゴ糖のみならず糖タンパク質(ブ タ胃ムチン)のO-型糖鎖にH抗原を導入することが可 能であった.これらの結果は、本研究で作出された 1,2-α-L-フコシンターゼが糖鎖生物学において有用な ツールとして機能することを示している.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 杉山友太,後藤愛那,本多裕司,吉田永史奈,栗原新,北岡本 光,山本憲二,片山高嶺. 2015. ヒトミルクオリゴ糖の酵素 合成に向けた高効率1,2-α-L-fucosynthaseの作出. 2015年度 日本農芸化学会. 3月26-29日. 岡山.
- 2) 杉山友太,加藤紀彦,後藤愛那,本多裕司,吉田永史奈,栗原 新,北岡本光,山本憲二,片山高嶺. 2015. ビフィズス菌由来 1,2α-Lfucosidaseの高効率フコシンターゼ化-ヒトミルクオ リゴ糖の酵素合成への応用-. 2015年度日本農芸化学会中 部・関西支部合同大会.9月19-20日.富山.
- 3) 杉山友太,加藤紀彦,後藤愛那,本多裕司,吉田永史奈,栗原 新,北岡本光,山本憲二,片山高嶺. 2016. 高効率1,2-α-L-fucosynthaseを用いたO-型およびN-型糖鎖のフコシル化. 2016 年度日本農芸化学会. 3月27-30日. 北海道.
- 4) 杉山友太,加藤紀彦,後藤愛那,本多裕司,吉田永史奈,栗原 新,芦田久,熊谷英彦,山本憲二,北岡本光,片山高嶺. 2017. 高効率1,2-α-L-fucosynthaseの作出とH抗原含有オリゴ糖お よび糖タンパク質創製への応用.第10回北陸合同バイオシ ンポジウム.11月10-11日.富山.
- 原著論文
 - Sugiyama, Y., Gotoh, A., Katoh, T., Honda, Y., Yoshida, E., Kurihara, S., Ashida, H., Kumagai, H., Yamamoto, K., Kitaoka, M. & Katayama, T. 2017. Introduction of H-antigens into oligosaccharides and sugar chains of glycoproteins

using highly efficient 1,2- α -L-fucosynthase. Glycobiology. **26**:1235 – 1247.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所寄付講座助成金によ り行われたものである.本助成を賜った公益財団法人発 酵研究所に厚く御礼申し上げます.MALDI-TOF MS分析 は文部科学省のナノテクノロジープラットフォームプロ グラムの支援を受けて北陸先端科学技術大学で行われた.

文 献

- Angyal SJ. & Pickles V. 1972. Equilibria between pyranoses and furanoses. II. Aldoses. Aust. J. Chem., 25:1695-1710.
- Anumula, K.R. & Taylor, P.B. 1992. A comprehensive procedure for preparation of partially methylated alditol acetates from glycoprotein carbohydrates. Anal. Biochem. 203:101-108.
- Aoki, K., Porterfield, M., Lee, S.S., Dong, B., Nguyen, K., McGlamry, K.H. & Tiemeyer, M. 2008. The diversity of *O*-linked glycans expressed during *Drosophila melanogaster* development reflects stage- and tissue-specific requirements for cell signaling. J. Biol. Chem. **283**:30385-30400.
- Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Ashida, H., Hirose, J. & Kitaoka, M. 2011. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. J. Biol. Chem. 286:34583-34592.
- Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H., Katayama, T. & Yamamoto, K. 2009. Two distinct alpha-L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. Glycobiology 19:1010-1017.
- Baumgärtner, F., Seitz, L., Sprenger, G.A. & Albermann, C. 2013. Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. Microb. Cell. Fact. 12:40.
- Brand-Miller, J.C., McVeagh, P., McNeil, Y. & Messer, M. 1998. Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. J. Pediatr. 133:95-98.
- Bry, L., Falk, P.G., Midtvedt, T. & Gordon, J.I. 1996. A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. Science 273:1380-1383.
- Ceroni, A., Maass, K., Geyer, H., Geyer, R., Dell, A. & Haslam, S.M. 2008. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. J. Proteome. Res. 7:1650-1659.
- Drouillard, S., Driguez, H. & Samain, E. 2006. Large-scale synthesis of H-antigen oligosaccharides by expressing *Helicobacter pylori* alpha1,2-fucosyltransferase in metabolically engineered *Escherichia coli* cells. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 45:1778-1780.
- Goto, Y., Obata, T., Kunisawa, J., Sato, S., Ivanov, I.I., Lamichhane, A., Takeyama, N., Kamioka, M., Sakamoto, M.,

Matsuki, T., Setoyama, H., Imaoka, A., Uematsu, S., Akira, S., Domino, SE., Kulig, P., Becher, B., Renauld, JC., Sasakawa, C., Umesaki, Y., Benno, Y. & Kiyono, H. 2014. Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. Science **345**:1254009.

- Gotoh, A., Katoh, T., Sugiyama, Y., Kurihara, S., Honda, Y., Sakurama, H., Kambe, T., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2015. Novel substrate specificities of two lacto-N-biosidases towards β-linked galacto-N-biose-containing oligosaccharides of globo H, Gb5, and GA1. Carbohydr. Res. 408:18-24.
- Hakomori, S. 1999. Antigen structure and genetic basis of histoblood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. Biochim. Biophys. Acta. 1473:247-266.
- He, Y., Liu, S., Kling, D.E., Leone, S., Lawlor, N.T., Huang, Y., Feinberg, S.B., Hill, D.R. & Newburg, D.S. 2016. The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose modulates CD14 expression in human enterocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation. Gut 65:33-46.
- Hehre, E.J., Brewer, C.F. & Genghof, D.S. 1979. Scope and mechanism of carbohydrase action. Hydrolytic and nonhydrolytic actions of beta-amylase on alpha- and beta-maltosyl fluoride. J. Biol. Chem. 254:5942-5950.
- Heimburg-Molinaro, J., Lum, M., Vijay, G., Jain, M., Almogren, A. & Rittenhouse-Olson, K. 2011. Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. Vaccine 29:8802-8826.
- Helland, R., Larsen, R.L., Finstad, S., Kyomuhendo, P. & Larsen, A.N. 2009. Crystal structures of g-type lysozyme from Atlantic cod shed new light on substrate binding and the catalytic mechanism. Cell Mol. Life Sci. 66:2585-2598.
- Hidaka, M., Fushinobu, S., Honda, Y., Wakagi, T., Shoun, H. & Kitaoka, M. 2010. Structural explanation for the acquisition of glycosynthase activity. J. Biochem. 147:237-244.
- Honda, Y., Arai, S., Suzuki, K., Kitaoka, M. & Fushinobu, S. 2016. The crystal structure of an inverting glycoside hydrolase family 9 exo-β-D-glucosaminidase and the design of glycosynthase. Biochem. J. 473:463-472.
- Honda, Y. & Kitaoka, M. 2006. The first glycosynthase derived from an inverting glycoside hydrolase. J. Biol. Chem. 281:1426-1431.
- Karlsson, NG., Herrmann, A., Karlsson, H., Johansson, ME., Carlstedt, I. & Hansson, GC. 1997. The glycosylation of rat intestinal Muc2 mucin varies between rat strains and the small and large intestine. A study of O-linked oligosaccharides by a mass spectrometric approach. J. Biol. Chem. 272:27025–27034.
- Katayama, T. 2016. Host-derived glycans serve as selected nutrients for the gut microbe: human milk oligosaccharides and bifidobacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. **80**:621-632.
- Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T., Makimura, Y., Hiratake, J., Sakata, K., Yamanoi, T., Kumagai, H. & Yamamoto, K. 2004. Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2-alpha-I-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). J. Bacteriol. 186:4885-4893.
- Kitaoka, M., Tian, J. & Nishimoto, M. 2005. Novel putative galactose operon involving lacto-*N*-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. Appl. Environ. Microbiol. **71**:3158-3162.

- Kobata, A. 2010. Structures and application of oligosaccharides in human milk. Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. 86:731-747.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. & Strobel, S. 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. Annu. Rev. Nutr. 20:699-722.
- Lewis, Z.T., Totten, S.M., Smilowitz, J.T., Popovic, M., Parker, E., Lemay, D.G., Van Tassell, M.L., Miller, M.J., Jin, Y.S., German, J.B., Lebrilla, C.B. & Mills, D.A. 2015. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. Microbiome 3:13.
- Liu, J., Zheng, M., Zhang, C. & Xu, D. 2013. "Amide resonance" in the catalysis of 1,2-α-L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*. J. Phys. Chem. B. 117:10080-10092.
- Mackenzie, LF., Wang, Q., Warren, RAJ. & Withers, SG. 1998. Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis. J. Am. Chem. Soc. 120:5583–5584.
- Malet, C. & Planas, A. 1998. From beta-glucanase to beta-glucansynthase: glycosyl transfer to alpha-glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. FEBS Lett. **440**:208-212.
- McGovern, D.P., Jones, M.R., Taylor, K.D., Marciante, K., Yan, X., Dubinsky, M., Ippoliti, A., Vasiliauskas, E., Berel, D., Derkowski, C., Dutridge, D., Fleshner, P., Shih, D.Q, Melmed, G., Mengesha, E., King, L., Pressman, S., Haritunians, T., Guo, X., Targan, S.R., Rotter, J.I; International IBD Genetics Consortium. 2010. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. Hum. Mol. Genet. 19:3468-3476.
- Mollicone, R., Candelier, J.J., Reguigne, I., Couillin, P., Fletcher, A. & Oriol, R. 1994. Molecular genetics of alpha-L-fucosyltransferase genes (H, Se, Le, FUT4, FUT5 and FUT6). Transfus. Clin. Biol. 1:91-97.
- Nagae, M., Tsuchiya, A., Katayama, T., Yamamoto, K., Wakatsuki, S. & Kato, R. 2007. Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1,2-alpha-L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum.* J. Biol. Chem. 282:18497-18509.
- Ohnuma, T., Fukuda, T., Dozen, S., Honda, Y., Kitaoka, M. & Fukamizo, T. 2012. A glycosynthase derived from an inverting GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum*. Biochem. J. 444:437-443.
- Osanjo, G., Dion, M., Drone, J., Solleux, C., Tran, V., Rabiller, C. & Tellier, C. 2007. Directed evolution of the alpha-L-fucosidase from *Thermotoga maritima* into an alpha-L-transfucosidase. Biochemistry 46:1022-1033.
- Pacheco, A.R., Curtis, M.M., Ritchie, J.M., Munera, D., Waldor, M.K., Moreira, C.G. & Sperandio, V. 2012. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. Nature 492:113-117.
- Pham, T.A., Clare, S., Goulding, D., Arasteh, J.M., Stares, M.D., Browne, H.P., Keane, J.A., Page, A.J., Kumasaka, N., Kane, L., Mottram, L., Harcourt, K., Hale, C., Arends, M.J., Gaffney, D.J., Sanger Mouse Genetics Projec.t, Dougan, G. & Lawley, T.D. 2014. Epithelial IL-22RA1-mediated fucosylation promotes intestinal colonization resistance to an opportunistic pathogen. Cell Host Microbe. 16:504-516.
- Pickard, J.M., Maurice, C.F., Kinnebrew, M.A., Abt, M.C., Schenten, D., Golovkina, T.V., Bogatyrev, S.R., Ismagilov, R.F., Pamer, E.G., Turnbaugh, P.J. & Chervonsky, A.V. 2014. Rapid

fucosylation of intestinal epithelium sustains host-commensal symbiosis in sickness. Nature **514**:638-641.

- Rouquier, S., Lowe, J.B., Kelly, R.J., Fertitta, A.L., Lennon, G.G. & Giorgi, D. 1995. Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus. J. Biol. Chem. 270:4632-4639.
- Ruiz-Palacios, G.M., Cervantes, L.E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B. & Newburg, D.S. 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. J. Biol. Chem. 278:14112-14120.
- Sakurama, H., Kiyohara, M., Wada, J., Honda, Y., Yamaguchi, M., Fukiya, S., Yokota, A., Ashida, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2013. Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of *Bifidobacterium longum* subspecies *longum* shows unique substrate specificity and requires a designated chaperone for its active expression. J. Biol. Chem. 288,:25194-25206.
- Sakurama, H., Tsutsumi, E., Ashida, H., Katayama, T., Yamamoto, K. & Kumagai, H. 2012. Differences in the substrate specificities and active-site structures of two α-1-fucosidases (glycoside hydrolase family 29) from *Bacteroides thetaiotaomicron*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **76**:1022-1024.
- Sela, D.A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J.H., Chen, F., Whitehead, T.R., Lapidus, A., Rokhsar, D.S., Lebrilla, C.B., German, J.B., Price, N.P., Richardson, P.M. & Mills, D.A. 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 105:18964-18969.
- Shaikh, F.A. & Withers, S.G. 2008. Teaching old enzymes new tricks: engineering and evolution of glycosidases and glycosyl transferases for improved glycoside synthesis. Biochem. Cell Biol. 86:169-177.
- Smyth, D.J., Cooper, J.D., Howson, J.M., Clarke, P., Downes, K., Mistry, T., Stevens, H., Walker, N.M. & Todd, J.A. 2011. FUT2 nonsecretor status links type 1 diabetes susceptibility and

resistance to infection. Diabetes 60,:3081-3084.

- Su, A.I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K.A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M.P., Walker, J.R. & Hogenesch, J.B. 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 101:6062-6067.
- Sugiyama, Y., Gotoh, A., Katoh, T., Honda, Y., Yoshida, E., Kurihara, S., Ashida, H., Kumagai, H., Yamamoto, K., Kitaoka, M. & Katayama, T. 2016. Introduction of H-antigens into oligosaccharides and sugar chains of glycoproteins using highly efficient 1,2-α-L-fucosynthase. Glycobiology 26:1235-1247.
- Tateno, H., Matsushima, A., Hiemori, K., Onuma, Y., Ito, Y., Hasehira, K., Nishimura, K., Ohtaka, M., Takayasu, S., Nakanishi, M., Ikehara, Y., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Chan, T., Toyoda, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Asashima, M. & Hirabayashi J. 2013. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. Stem Cells Transl. Med. 2:265-273.
- Urashima, T., Asakuma, S., Leo, F., Fukuda, K., Messer, M. & Oftedal, O.T. 2012. The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. Adv. Nutr. **3**:473S-482S.
- Wada, J., Ando, T., Kiyohara, M., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamaguchi, M., Kumagai, H., Katayama, T. & Yamamoto, K. 2008a. *Bifidobacterium bifidum* lacto-*N*-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. Appl. Environ. Microbiol. **74**:3996-4004.
- Wada, J., Honda, Y., Nagae, M., Kato, R., Wakatsuki, S., Katayama, T., Taniguchi, H., Kumagai, H., Kitaoka, M. & Yamamoto, K. 2008b. 1,2-α-L-Fucosynthase: a glycosynthase derived from an inverting alpha-glycosidase with an unusual reaction mechanism. FEBS Lett. 582:3739-3743.
- Zhao, C., Wu, Y., Yu, H., Shah, I.M., Li, Y., Zeng, J., Liu, B., Mills, D.A. & Chen, X. 2016. The one-pot multienzyme (OPME) synthesis of human blood group H antigens and a human milk oligosaccharide (HMOS) with highly active *Thermosynechococcus elongatus* α1-2-fucosyltransferase. Chem. Commun. (Camb) **52**:3899-3902.

高効率 1,2-α-L-fucosynthase の応用展開 杉山 友太、片山 高嶺、栗原 新

石川県立大学生物資源環境学部寄付講座腸内細菌共生機構学 〒921-8836 石川県野々市市末松1-308

Versatility evaluation of 1,2-α-L-fucosynthase

Yuta Sugiyama, Takane Katayama, Shin Kurihara

Host-Microbe Interaction Research Laboratory Faculty of Bioresources and Environmental Sciences Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

A highly efficient 1,2- α -L-fucosynthase (*Bb*AfcA^{N423H}) generated by protein engineering of 1,2- α -L-fucosidase was further examined for its versatility. The enzyme was found to introduce H-antigen into *N*- and *O*-glycans in fetuin glycoproteins, GM1 ganglioside, and a plant-derived xyloglucan nonasaccharide. This study broadens the feasibility of this novel H-antigen synthesis technique in functional glycomics.

Key words: 1,2- α -L-fucosynthase, H-antigen, N-glycan, glycolipid, xyloglucan

緒 言

オリゴ糖やタンパク質糖鎖のフコシル化修飾は,糖鎖 -タンパク質および細胞間相互作用を調節する因子とし て主に複合糖質の糖鎖の非還元末端に見られる(Lowe, 2002; Pickard & Chervonsky, 2015). ヒトにおいては α-1,2-フコシルトランスフェラーゼ(FUT1および FUT2)によりフコース(Fuc)α-1,2ガラクトース(Gal) 二糖構造(Fucα1-2Gal: H抗原と呼ばれる)が合成され, 糖タンパク質および糖脂質上に血液型抗原決定基が形成 される(Kelly *et al.*, 1994; Mollicone *et al.*, 1994; Rouquier

E-mail:

- 杉山友太 (sugiyama.yuta.6s@kyoto-u.ac.jp) (現所属:京都大 学大学院農学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白 川追分町),
- 片山高嶺 (takane@lif.kyoto-u.ac.jp) (現所属:京都大学大学院 生命科学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白川追 分町),
- 栗原 新 (skurihara@waka.kindai.ac.jp) (現所属:近畿大学生 物理工学部食品安全工学科 〒 649-6493 和歌山県紀 の川市西三谷 930)
- 共同研究者
- 加藤紀彦(京都大学大学院生命科学研究科),
- 後藤愛那(京都大学大学院生命科学研究科),
- 本多裕司(石川県立大学生物資源環境学部),
- 芦田 久 (近畿大学生物理工学部食品安全工学科),
- 山本憲二 (石川県立大学生物資源工学研究所)

et al., 1995; Hakomori, 1999). H抗原は病原菌感染の予防などの有益な効果を示し、宿主と腸内微生物叢との共生を確立するための構造として知られている(Ruiz-Palacios et al., 2003; Goto et al., 2014; Pham et al., 2014). 例えば、母親は乳中に2⁻フコシルラクトース(2¹-FL)および他のフコシル化ヒト乳糖オリゴ糖(Human Milk Oligosaccharide, HMO)を分泌して児に供給している (Kunz et al., 2000; Kobata, 2010; Urashima et al., 2012). 高等植物では、 α -1,2-フコシル基により苗の成長が調節 されることも知られている(Zablackis et al., 1996; Dumont et al., 2015). したがって、フコシル化糖の合成は、様々 な生物において観察されるフコシル基が介在する細胞応 答の詳細な分子メカニズムの解明に役立つと考えられる.

我々は, Fucα1-2Gal 結合の形成を触媒するが Fucα1-2Gal 結合に対する加水分解活性を失った高効率 1,2-α-L-フコ シンターゼ (*Bb*AfcA^{N423H}) を作出することに成功して いる (Sugiyama *et al.*, 2016).本研究では、種々の複合 糖質を用いて *Bb*AfcA^{N423H}のさらなる応用を試みた.

実験方法

組換えタンパク質の調製

Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482 由来の1,3-1,4- α -L-フコシダーゼ (BT_2970),野生型 BbAfcA および

*Bb*AfcA^{N423H}は以前の報告と同様に調製した(Sakurama *et al.*, 2012; Sugiyama *et al.*, 2016).

GM1のフコシル化

 $50\mu g$ のガングリオシドGM1 (Sigma-aldrich) を $2\mu L$ のジメチルスルホキシドで溶解した. 1mg/mLガング リオシドGM1, 10mM β -FucF および 10 μ M BbAfcA^{N423H} を含む50µLの100mMクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5)を30℃で60分間インキュベートした.反応 液はシリカゲル60アルミニウムシート (Merck) を用 いた薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した.展 開溶媒は、クロロホルム/メタノール/0.2%塩化カルシ ウム (60/3/8, v/v/v) とした. TLC プレートの呈色は, ジフェニルアミン-アニリン-リン酸試薬で行った (Anderson et al., 2000). さらに、マトリックス支援レー ザー脱離イオン化法(MALDI-TOF-MS)分析を行うため、 反応産物を Sep-Pak C₁₈ カートリッジカラム (Waters) を用いて精製した.まず、アセトン沈殿によって酵素を 除去し、上清を遠心濃縮によって乾固し、50%メタノー ルで再溶解した. サンプルを蒸留水で予め平衡化した Sep-Pak C₁₈カラムにアプライし、クロロホルム-メタ ノール (2/1, v/v) で溶出し, 窒素雰囲気下で乾燥した.

植物キシログルカンのフコシル化

10 mM または 2 mM xyloglucan nonasaccharide (XLLG, Tokyo Chemical Industries), 10 mM β-FucF および 10 μ M *Bb*AfcA^{N423H} を含有する 100 μ Lの 100 mM クエン酸ナト リウム緩衝液 (pH5.5) を 30℃で 30 分間インキュベー トした.反応液はパルスアンペロメトリック検出器を備 えた高速陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC-PAD) (Dionex) で分析した. CarboPac PA1 カラム (2× 250 mm, Dionex) を 30℃で使用し,溶出は 125 mM 水 酸化ナトリウムと酢酸ナトリウムの 20 分間のリニアグ ラジエント (0~330 mM) で 0.25 mL/min で行った.

糖タンパク質のフコシル化

アシアロフェツイン (Sigma-aldrich) はシアリダー ゼ (コレラ菌由来, Roche)処理により残留シアル酸残 基を除去した後,フコシンターゼ反応に使用した. 1mg/mLアシアロフェツイン,10mM β-FucF および 10 μ M *Bb*AfcA^{N423H}を含む100mMのクエン酸ナトリウム 緩衝液 (pH5.5) 250 μ Lを30℃で60分間インキュベー トし,95℃で3分間処理することで反応を停止させ, 10mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.0) に対して透析した後, 糖鎖分析に供した. ピリジルアミノ(PA)標識糖鎖を用いたフコシンター ゼ反応

2μM PA標識糖鎖 (TaKaRa), 100μM β-FucF および 10 µM BbAfcA^{N423H}を含有する 60 µLの 100 mM クエン酸 ナトリウム緩衝液 (pH5.5) を 30℃で 60 分間インキュ ベートした.反応液は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した. Waters e2695 separation module (Waters)を用い, カラムは TSKgel Amide-80 カラム (4.6 ×250mm, Tosoh)を使用した. カラムオーブンは 40℃とした. 溶出は溶媒A(アセトニトリル/10%アセ トニトリル含有 500mM 酢酸-トリエチルアミン(pH7.3) =75/15) および溶媒B(アセトニトリル/10%アセト ニトリル含有 500 mM 酢酸-トリエチルアミン (pH7.3) =40/50) を用いて1mL/minの流速で行った. 溶媒 Bの グラジエント(100分間で0→100%)とし、20分間100% で保持した. 溶出液はWaters 2475 Multi-wavelength Fluorescence Detector (Waters) (λ_{ev} : 310nm, λ_{em} : 380nm) でモニターした.

レクチンブロット

アシアロフェツインサンプル (2 μ g) を SDS-PAGE で分離し,次いで PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore) へ転写した.ブロッキング溶液 [2% (w/v) ウシ血清 アルブミンおよび 0.05% (v/v) Tween-20 含有 Tris 緩 衝生理食塩水]と共に1時間インキュベートし,膜をビオ チン結合レクチン (0.4μ g/mL; *Ulex europaeus* agglutinin I, UEA-1 または Peanut agglutinin, PNA) (J-Oil Mills) およびペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン (0.125μ g/mL) を含むブロッキング溶液と共に1時間 インキュベートした.膜を Tris 緩衝生理食塩水で洗浄 し,SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fischer Scientific) および Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm) を用いて検出した.

N-型糖鎖の調製

N-型糖鎖は、ペプチド-*N*-グリカナーゼ (PNGF, Roche)を用いて調製した.まず糖タンパク質をトリプ シン処理し、糖ペプチドまで消化した.糖タンパク質サ ンプルを凍結乾燥し、10mM塩化カルシウムを含む 100mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.2) 200 μ Lで再溶解し、 次いで5 μ Lの20mg/mLトリプシンを添加し、37℃で 15.5時間インキュベートした.その後、サンプルを遠心 分離(15,000rpm、4℃、10分)し、上清を回収した. 沈殿を水で再懸濁し、再度遠心分離し、上清を回収した. 両方の上清を合一し、遠心濃縮により乾燥させた.乾燥 したトリプシン消化ペプチドを300 μ Lの5%(v/v)酢 酸で再溶解し、5%酢酸で予め平衡化した Sep-Pak C₁₈ カートリッジカラムへ添加し、5%酢酸で洗浄した.糖 ペプチドを、20%イソプロパノール含有5%酢酸および 40%イソプロパノール含有5%酢酸で溶出した.糖ペプ チドから N-型糖鎖を遊離させるために、溶出液を遠心 濃縮機で乾燥し、27 μ Lの蒸留水と20 μ Lの100mMリン 酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)を添加、再溶解し、次い で3 μ Lの PNGFを加えた.反応溶液を37℃で16時間イ ンキュベートし、乾燥させた.乾燥後、サンプルを 300 μ Lの5%酢酸で溶解し、予め平衡化した Sep-Pak C₁₈ カラムにアプライした.夾雑物を除き、糖ペプチドから 遊離した N-型糖鎖を含む5%酢酸溶出画分を回収し、 凍結乾燥後、糖鎖を完全メチル化し、MALDI-TOF-MS 分析に供した.糖鎖の完全メチル化は Sugiyama *et al.*, (2016) と同様に行った.

O-型糖鎖の調製

Sep-Pak C₁₈カートリッジカラムで糖タンパク質から 遊離したN-型糖鎖を回収した後, O-型糖鎖を含有する 糖ペプチドを20%および40%イソプロパノール含有 5%酢酸で溶出し、O-型糖鎖の分析に使用した.糖ペプ チドから O-型糖鎖を遊離させるため、還元 B 脱離法を 用いた. 糖ペプチド(80~100µg)を1M水素化ホウ 素ナトリウムを含む 100mM 水酸化ナトリウム 500 µL で 溶解し、45℃で18時間インキュベートした、インキュ ベート後, 氷上に静置し, 10% (v/v) 酢酸を加えて反 応液を中和した.次にサンプルを Dowex-50W-X8(H⁺型. 100-200m, Sigma-aldrich) カラムで脱塩し、フロース ルー画分および5%酢酸での洗浄画分を集めて凍結乾燥 した. 10%酢酸含有メタノール 0.3mLを加え,残留ホ ウ酸塩をメタノールとの共沸混合物として40℃の窒素 流下で除去した.ホウ酸塩を完全に除去するために、こ の工程を5回繰り返した. 遊離したオリゴ糖アルジトー ルを 0.3 mL の 5% 酢酸に溶解し, Sep-pak C₁₈ カートリッ ジカラムを用いて精製した. 遊離したオリゴ糖アルジ トールを含有するフロースルー画分を回収,凍結乾燥し, 完全メチル化後, MALDI-TOF-MS分析に供した.

MALDI-TOF-MS 分析

MALDI-TOF-MS(UltrafleXtrem, Bruker)分析にお いて、完全メチル化糖鎖はポジティブイオンモードで、 ガングリオシドGM1およびフコシルガングリオシド GM1はネガティブイオンモードで使用した.マトリッ クスとして2,5-ジヒドロキシ安息香酸を用いた. MALDI-TOF/TOF-MS解析によりMS/MSスペクトルを 得た.糖鎖の理論質量はソフトウェアGlycoWorkbench 2.0(Ceroni *et al.*, 2008)を用いて計算した.

導入フコースの結合様式の決定

フコシンターゼ反応により導入されたFucのグリコシ ド結合の様式は、Fucの結合様式に対して高い特異性を 示す1,2- α -L-フコシダーゼ(野生型*Bb*AfcA)および 1,3-1,4- α -L-フコシダーゼ(BT_2970)処理により解析 した. 1,2- α -L-フコシダーゼ反応産物を含有する 150 μ Lの100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を 37℃でインキュベートすることで行った. 1,3-1,4- α -L-フコシダーゼ処理は、1.8 μ M BT_2970 およびフコシン ターゼ反応産物を含有する 150 μ Lの100mM 2-モルホリ ノエタンスルホン酸緩衝液(pH6.0)を 37℃でインキュ ベートすることで行った. 処理後、試料を前述のように MALDI-TOF MS および MALDI-TOF/TOF MS によって 分析した.

結果および考察

アシアロフェツインの*N*-および*O*-型糖鎖のフコシル化 1,2-α-L-フコシンターゼ(*Bb*AfcA^{N423H})が糖タンパク 質の*N*-型糖鎖にFucを導入できるかを調べるために, 最初にモデル糖タンパク質としてウシ胎児血清由来のア シアロフェツイン上の*N*-型糖鎖のフコシル化を試みた. フェツインは,そのポリペプチド上に3本の*N*-型糖鎖 と3本の*O*-型糖鎖を有する48kDaのタンパク質である.

MALDI-TOF-MS 分析によりアシアロフェツインはN-型糖鎖として主にトリアンテナ型(m/z 2520.4)を,次 いでバイアンテナ型 (m/z 2071.2) とシアリダーゼ耐性 モノシアロトリアンテナ型(m/z 2881.6)を有していた (Fig. 1Aa). 一方, BbAfcA^{N423H}処理アシアロフェツイン のMSスペクトルは、m/z 2694.5のシグナルの明瞭な増 加, さらに m/z 2245.2, 2868.1, 3055.6 のシグナルの出 現を示した(Fig.1Ab). これらのシグナルが示す質量は、 アシアロフェツインが元々有している m/z 2071.2, 2520.4 および 2881.6 の糖鎖に1つ (*m/z* +174) または2 つ (m/z + 348) のデオキシヘキソース (dHex, Fuc は デオキシへキソースの一つ)が付加した場合の質量と一 致した. 実際に, m/z 2694 のシグナルの MS/MS スペク トルは、モノフコシル化トリアンテナ型N-型糖鎖に対 応するフラグメントパターンを示した (データ未掲載). さらに,m/z433および2284のフラグメントイオンは末 端デオキシへキソース (dHex) 構造の存在を示し、こ れは Gal 残基のフコシル化を示唆している。α-L-フコシ ダーゼ処理の結果, Fuca1-2 結合であることが明らかと なった (Fig. 1Ac および 1Ad).

アシアロフェツインのアシアロバイアンテナ型,アシ アロ-およびモノシアロトリアンテナ型*N*-型糖鎖への



Fig. 1. MALDI-TOF MS analysis of the permethylated *N*-glycans released from asialofetuin (A) and fetuin (B) treated with *Bb*AfcA^{M23H}.
(A) MS spectra obtained for the permethylated *N*-glycans released by PNGF from asialofetuin treated without (a) and with *Bb*AfcA^{M23H}.
(A) MS spectra obtained for the permethylated *N*-glycans released by PNGF from asialofetuin treated without (a) and with *Bb*AfcA^{M23H}.
(B) The sample (b) was further treated with 1,2-α-L-fucosidase *Bb*AfcA^{WT} (c) or 1,3–1,4-α-L-fucosidase (BT_2970) (d). (B) The same experiments were conducted using fetuine as an acceptor glycoprotein. The estimated glycan structures are shown .Sugars are depicted as: diamond, *N*-acetylneuraminic acid; filled circle, galactose; filled square, *N*-acetylglucosamine; filled triangle, fucose; open circle, mannose. This figure is modified from Figures 2 and 4 of Sugiyama *et al.* (2017). Biosci. Biotechnol. Biochem. 81:283-291.

Fuc の導入効率は MS のシグナル強度の比較より、それ ぞれ9.26.および20%と算出された、この結果より、 フコシル化の効率は糖鎖の種類により異なることが示さ れた. そこで. PAで標識されたバイ-およびトリアン テナ型 N-型糖鎖を用いて BbAfcA^{N423H}の特異性を解析し た.バイ-およびトリアンテナ型N-型糖鎖を基質とした 時. BbAfcA^{N423} 処理により、それぞれ2つおよび3つの ピークが HPLC で認められ、Fuc がバイアンテナ型では 1および2個、トリアンテナ型では1~3個導入されて いることが示唆された (データ未掲載). 基質の消費か ら算出したフコシル化効率は、バイ-およびトリアンテ ナ型N-型糖鎖においてそれぞれ80および81%であっ た. これらの結果は、BbAfcA^{N423H}は遊離のバイ-および トリアンテナ型N-型糖鎖を同程度の効率でアクセプ ターに出来ることを示唆した、したがって、アシアロフェ ツインにおけるフコシル化の効率の違いは、糖タンパク 質上の各糖鎖種への BbAfcA^{N423H}のアクセスのしやすさ に起因していると考えられた.

アシアロフェツインの O-型糖鎖のフコシル化も MALDI-TOF MS 分析によって明らかとなった. *Bb*AfcA^{N423H}処理後、フコシル化O-型糖鎖アルジトール (ナトリウム付加物)の質量と一致するいくつかのシグ ナル(m/z 708.5, Fuc1Gal1GalNAc-itol およびm/z 1157.7, Fuc1Gal2GlcNAc1GalNAc-itol)(GlcNAc; N-アセチルグ ルコサミン, GalNAc; N-アセチルガラクトサミン)が新 たに観察された(データ未掲載).以上の結果は、 *Bb*AfcA^{N423H}が糖タンパク質糖鎖にFuca1-2Gal構造を導 入可能であることを示している.

*Bb*AfcA^{N423H}を用いたシアル酸含有*N*-結合型糖鎖への Fucの導入

BbAfcA^{N423H}処理アシアロフェツインで検出された m/z 3055.6のシグナルのMS/MSスペクトルにおいて. NeuAc1dHex1Hex1HexNAc1の質量に対応する m/z 1022 $[M + Na]^+$ のフラグメントイオンが認められた (NeuAc; N-アセチルノイラミン酸. HexNAc: N-アセチルヘキソ サミン). この結果は、BbAfcA^{N423H}がシアル酸含有N-型糖鎖に対しても Fuc を導入できることを示唆してい た. そこで, アクセプターとしてフェツインを用いてフ コシンターゼ反応を実施した.フェツインではシアル酸 を含有する N-結合型糖鎖:ジシアロバイアンテナ (m/z 2793.4), トリシアロ- (*m/z* 3603.8) およびテトラシ アロ (*m/z* 3966.0) トリアンテナ型が主要な糖鎖として 検出された (Fig. 1Ba). 一方で, BbAfcA^{N423H}処理フェ ツインサンプルでは、モノフコシル化を有するシアル酸 含有N-型糖鎖に対応するピークがそれぞれ認められた (m/z 2967.5, 3778.9 および 4140.1) (Fig. 1Bb). これ

らのピークは野生型 BbAfcA処理で消失したが, BT_2970で処理した場合は変化せず,Fucがα-1,2結合 で糖鎖へ導入されたことが示された(Fig.1Bcおよび 1Bd). これらの結果は,NeuAca2-6結合を有するGal 残基においてもFuc導入が可能であることを示してい た.MSシグナルに基づくフコシル化効率はジシアロ-バイアンテナ型およびジシアロ-,トリシアロ-および テトラシアロ-トリアンテナ型N-型糖鎖において,それ ぞれ12,11,15および11%であった.

*Bb*AfcA と 2'-FL の共結晶構造においては, Gal 残基の O6 が溶媒側に露出している (Nagae *et al.*, 2007). すな わち *Bb*AfcA は, 糖鎖の非還元末端に存在する NeuAca2-6Gal 構造を収容するのに十分な空間を有する といえる.

糖脂質のフコシル化

次いで GM1 (Fig.2Aa) を用いてフコシル化を検証 した.モノフコシル GM1 は離乳期間中に哺乳動物の消 化管で発現することが示されており,さらに小細胞肺癌 および肝細胞癌の潜在的マーカーとしても報告されてい る (Wu *et al.*, 2012).

ウシ脳由来 GM1 を用いてフコシンターゼ反応を行い, 反応液をTLC分析により解析した.フコシンターゼ反応を行い, による生成物と考えられる新たなスポットが GM1 ス ポットの下に観察された(データ未掲載). MS分析に より, GM1 由来の m/z 1544.7 および m/z 1572.8 のピー クに加えて, m/z 1690.8 および m/z 1718.8 の新たなピー クが出現し, モノフコシル GM1 の推定質量と一致した (Fig.2Ab および 2Ac). これらのピークは BbAfcA 野生 型での処理で消失したことから, GM1 ガングリオシド のα-1,2-フコシル化が生じたことが示された(Fig.2Ad).

植物キシログルカンのフコシル化

キシログルカンは、高等植物の細胞壁におけるヘミセ ルロース多糖の主成分である. XLLG は β-1-4 結合グル コシル骨格を有し、グルコース (Glc)のC6 位に α 結 合したキシロース (Xyl) および Galβ1-2Xyl 残基の側鎖 を有する九糖である (Fig.2Ba).フコシル XLLG は植 物体内に存在し、オーキシン刺激成長に対して阻害活性 を示すことが報告されている (Augur *et al.*, 1992).

10mMのXLLGを用いてフコシンターゼ反応を行い、 反応液をHPAEC-PADへ供したところ、生成物と予想されるピークが *Bb*AfcA^{N423H}処理サンプルにおいて認められた (データ未掲載). この条件での反応効率はXLLG に対して 57%であった. 完全メチル化反応生成物の MS 分析によりモノ-(m/z 1948.2), ジ-(m/z 2122.3) およ びトリフコシル XLLG(m/z 2296.0)が *Bb*AfcA^{N423H}によっ

(A) Ganglioside GM1

(B) Xyloglucan nonasaccharide



Fig. 2. MALDI-TOF MS analysis of the reaction products using GM1 ganglioside (A) and xyloglucan nonasaccharide (B) as acceptors. (A) The structure of ganglioside GM1 is shown (a). Mass spectra obtained for GA1 without (b) and with *Bb*AfcA^{N423H} (c) treatment. The sample (c) was digested with 1,2-α-L-fucosidase *Bb*AfcA^{WT} to examine the glycoside linkage (d). Cer, Ceramide. (B) The structure of xyloglucan nonasaccharide (XLLG) is shown (a). Mass spectra obtained for XLLG without (b) and with *Bb*AfcA^{N423H} (c) treatment. This figure is modified from Figures 5 and 6 of Sugiyama *et al.* (2017). Biosci. Biotechnol. Biochem. **81**:283-291.

て生成されたことが示された(Fig.2Bb および 2Bc). シグナル強度から、トリフコシル XLLG はごく微量の生 成物であると示唆された(Fig.2Bc).以前の研究にお いて、フコシル基は Gal の C2 位のみならず、還元末端 Glc がα-アノマーの場合に C3 位でも起こり得ることを 示している(Sugiyama *et al.*, 2016). このフコシル XLLG の MS/MS 分析を行ったところ、m/z 1175に相当 するフラグメントイオンピークが認められ、3つ目のフ コシル基が還元末端の Glc 残基に付加されている可能性 が強く示された(データ未掲載).ただし、XLLG の還 元末端 Glc への Fuc の付加は、XLLG に比べて過剰な β-FucF が存在する場合のみ観察された. これらの結果 は *Bb*AfcA^{N423H} がフコシル化キシログルカンの産生に有 用であることを示している.

要 約

高効率 1,2-α-L-フコシンターゼ *Bb*AfcA^{N423H} が,フェ ツイン糖タンパク質の*N*-および *O*-結合型糖鎖,GM1 ガングリオシドおよび植物由来のキシログルカンに Fuc 残基を α1-2 結合で導入可能であることが示された.本 研究により *Bb*AfcA^{N423H}の糖鎖生物学ツールとしての有 用性が示された.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 杉山友太,加藤紀彦,後藤愛那,本多裕司,吉田永史奈,栗原 新,北岡本光,山本憲二,片山高嶺.2016.高効率1,2-α-Lfucosynthaseを用いたO-型およびN-型糖鎖のフコシル化. 2016年度日本農芸化学会.3月26-29日.北海道.
- 2) 杉山友太,加藤紀彦,後藤愛那,本多裕司,吉田永史奈,栗原 新,芦田久,熊谷英彦,山本憲二,北岡本光,片山高嶺. 2017. 高効率1,2-α-L-fucosynthaseの作出とH抗原含有オリゴ糖お よび糖タンパク質創製への応用.第10回北陸合同バイオシ ンポジウム.11月10-11日.富山.

原著論文

 Sugiyama, Y., Katoh, T., Honda, Y., Gotoh, A., Ashida, H., Kurihara, S., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2017. Application study of 1,2-α-L-fucosynthase: introduction of Fucα1-2Gal disaccharide structures on *N*-glycan, ganglioside, and xyloglucan oligosaccharide. Biosci. Biotechnol. Biochem. 81:283-291.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所寄付講座助成金およ び一般研究助成(加藤 紀彦)により行われたものである. 本助成を賜った公益財団法人発酵研究所に厚く御礼申し 上げます. MALDI-TOF MS分析は文部科学省のナノテ クノロジープラットフォームプログラムの支援を受けて 北陸先端科学技術大学で行われた.

文 献

- Anderson, K., Li, S.C. & Li, Y.T. 2000. Diphenylamine-anilinephosphoric acid reagent, a versatile spray reagent for revealing glycoconjugates on thin-layer chromatography plates. Anal. Biochem. 287:337-339.
- Augur, C., Yu, L., Sakai, K., Ogawa, T., Sinaÿ, P., Darvill, A.G. & Albersheim, P. 1992. Further studies of the ability of xyloglucan oligosaccharides to inhibit auxin-stimulated growth. Plant Physiol. 99:180-185.
- Ceroni, A., Maass, K., Geyer, H., Geyer, R., Dell, A. & Haslam, S.M. 2008. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. J. Proteome. Res. 7:1650-1659.
- Dumont, M., Lehner, A., Bardor, M., Burel, C., Vauzeilles, B., Lerouxel, O., Anderson, C.T., Mollet, J.C. & Lerouge, P. 2015. Inhibition of fucosylation of cell wall components by 2-fluoro 2-deoxy-L-fucose induces defects in root cell elongation. Plant J. 84:1137-1151.
- Goto, Y., Obata, T., Kunisawa, J., Sato, S., Ivanov, I.I., Lamichhane, A., Takeyama, N., Kamioka, M., Sakamoto, M., Matsuki, T., Setoyama, H., Imaoka, A., Uematsu, S., Akira, S., Domino, SE., Kulig, P., Becher, B., Renauld, JC., Sasakawa, C., Umesaki, Y., Benno, Y. & Kiyono, H. 2014. Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. Science 345:1254009.
- Hakomori, S. 1999. Antigen structure and genetic basis of histoblood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. Biochim. Biophys. Acta. 1473:247-266.
- Kelly, R.J., Ernst, L.K., Larsen, R.D., Bryant, J.G., Robinson, J.S. & Lowe, J.B. 1994. Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay (O_h) and para-Bombay individuals. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **91**:5843-5847.
- Kobata, A. 2010. Structures and application of oligosaccharides in human milk. Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. 86:731-747.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. & Strobel, S. 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. Annu. Rev. Nutr. 20:699-722.
- Lowe, J.B. 2002. Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. Immunol. Rev. **186**:19-36.
- Mollicone, R., Candelier, J.J., Reguigne, I., Couillin, P., Fletcher, A. & Oriol, R. 1994. Molecular genetics of α-L-fucosyltransferase genes (H, Se, Le, FUT4, FUT5 and FUT6). Transfus.

Clin. Biol. 1:91-97.

- Nagae, M., Tsuchiya, A., Katayama, T., Yamamoto, K., Wakatsuki, S. & Kato, R. 2007. Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1,2-α-L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*. J. Biol. Chem. **282**:18497-18509.
- Pham, T.A., Clare, S., Goulding, D., Arasteh, J.M., Stares, M.D., Browne, H.P., Keane, J.A., Page, A.J., Kumasaka, N., Kane, L., Mottram, L., Harcourt, K., Hale, C., Arends, M.J., Gaffney, D.J., Sanger Mouse Genetics Project, Dougan, G. & Lawley, T.D. 2014. Epithelial IL-22RA1-mediated fucosylation promotes intestinal colonization resistance to an opportunistic pathogen. Cell Host Microbe 16:504-516.
- Pickard, J.M. & Chervonsky, A.V. 2015. Intestinal fucose as a mediator of host-microbe symbiosis. J. Immunol. 194:5588-5593.
- Rouquier, S., Lowe, J.B., Kelly, R.J., Fertitta, A.L., Lennon, G.G. & Giorgi, D. 1995. Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus. J. Biol. Chem. **270**:4632-4639.
- Ruiz-Palacios, G.M., Cervantes, L.E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B. & Newburg, D.S. 2003. Campylobacter jejuni binds intestinal H(O) antigen (Fucα1,2Galβ1,4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. J. Biol. Chem. 278:14112-14120.
- Sakurama, H., Tsutsumi, E., Ashida, H., Katayama, T., Yamamoto, K. & Kumagai, H. 2012. Differences in the substrate specificities and active-site structures of two α-L-fucosidases (glycoside hydrolase family 29) from *Bacteroides thetaiotaomicron*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **76**:1022-1024.
- Sugiyama, Y., Gotoh, A., Katoh, T., Honda, Y., Yoshida, E., Kurihara, S., Ashida, H., Kumagai, H., Yamamoto, K., Kitaoka, M. & Katayama, T. 2016. Introduction of H-antigens into oligosaccharides and sugar chains of glycoproteins using highly efficient 1,2-α-L-fucosynthase. Glycobiology **26**:1235-1247.
- Sugiyama, Y., Katoh, T., Honda, Y., Gotoh, A., Ashida, H., Kurihara, S., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2017. Application study of 1,2-α-l-fucosynthase: introduction of Fucα1-2Gal disaccharide structures on *N*-glycan, ganglioside, and xyloglucan oligosaccharide. Biosci. Biotechnol. Biochem. **81**:283-291.
- Urashima, T., Asakuma, S., Leo, F., Fukuda, K., Messer, M. & Oftedal, O.T. 2012. The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. Adv. Nutr. 3:473S-482S.
- Wu, C.S., Yen, C.J., Chou, R.H., Li, S.T., Huang, W.C., Ren, C.T., Wu, C.Y. & Yu, Y.L. 2012. Cancer-associated carbohydrate antigens as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma. PLoS One 7:e39466.
- Zablackis, E., York, W.S., Pauly, M., Hantus, S., Reiter, W.D., Chapple, C.C., Albersheim, P. & Darvill, A. 1996. Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of *Arabidopsis mur1*. Science 272:1808-1810.

Bifidobacterium bifidum によるヒト母乳オリゴ糖分解物の クロスフィーディングがビフィズスフローラ形成を促す 後藤 愛那,阪中 幹祥,栗原 新,片山 高嶺

石川県立大学生物資源環境学部寄付講座腸内細菌共生機構学 〒921-8836 石川県野々市市末松1-308

Bifidobacterium bifidum enhances bifidus flora formation in fecal cultures by sharing human milk oligosaccharide degradants within bifidobacterial communities Aina Gotoh, Mikiyasu Sakanaka, Shin Kurihara, Takane Katayama

> Host-Microbe Interaction Research Laboratory Faculty of Bioresources and Environmental Sciences Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

Gut microbiota of breast-fed infants is generally rich in bifidobacteria. Recent in vitro studies have revealed that infant gut-associated bifidobacteria specifically possess gene and enzyme sets to degrade human milk oligosaccharides (HMOs), which suggests selective growth of the organisms in infant guts. Interestingly, however, HMO assimilation ability of Bifidobacterium sp. is not related to the dominance of each species in the intestines. Bifidobacterium longum susbp. longum and Bifidobacterium breve are the dominant species in infant stools; however, they show very limited HMOs assimilation ability in vitro. In contrast, Bifidobacterium bifidum and Bifidobacterium longum subsp. infantis are less abundant in infant stools despite that their in vitro HMO degradation ability is very high. In this study, we observed altruistic behavior by B. bifidum when incubated in fecal cultures supplemented with HMOs as a carbon source. Four B. bifidum strains, all of which were found to possess complete sets of HMO-degrading genes, left HMOs degradants unconsumed during *in vitro* growth. These strains stimulated the growth of other *Bifidobacterium* species when added to fecal cultures containing HMOs, thereby increasing the relative abundance of bifidobacteria in fecal communities. HMO consumption was also enhanced in B. bifidum-supplemented cultures. The addition of deoxyfuconojirimycin, a potent fucosidase inhibitor, abolished the growth stimulatory effect exerted by B. bifidum. The altruistic behavior by B. bifidum was not observed in the medium supplemented with glucose as a carbon source. These results suggest B. bifidummediated cross-feeding of HMOs degradants within bifidobacterial communities.

Key words: Bifidobacterium, human milk oligosaccharides, secretory glycosidases, cross-feeding

E-mail:

- 後藤愛那 (aina.g1985@gmail.com) (現所属:京都大学大学院 生命科学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白川追 分町),
- 阪中幹祥(miksak@dtu.dk)(現所属: National Food Institute, Technical University of Denmark, Kemitorvet, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark),
- 片山高嶺 (takane@lif.kyoto-u.ac.jp) (現所属:京都大学大学院 生命科学研究科 〒 606-8502 京都市左京区北白川追 分町),
- 栗原 新 (skurihara@waka.kindai.ac.jp) (現所属:近畿大学生 物理工学部 〒 649-6433 和歌山県紀の川市西三谷 930)

共同研究者 加藤紀彦(京都大学大学院生命科学研究科), Yiwei Ling(新潟大学大学院医歯学総合研究科), 山田千早(東京大学大学院農学生命科学研究科), 朝隈貞樹(国立研究開発法人農研機構), 浦島 匡(帯広畜産大学生命・食料科学研究部門), 苫米地祐輔(東海大学工学部), 片山礼子(石川県立大学生物資源環境学部), 山本憲二(石川県立大学生物資源環境学部), 原田 岳(タカナシ乳業株式会社), 何 方(タカナシ乳業株式会社), 廣瀬潤子(滋賀県立大学人間文化学部), 北岡本光(国立研究開発法人農研機構), 奥田修二郎(新潟大学大学院医歯学総合研究科)

緒 言

哺乳類の腸に棲息する何兆もの細菌は、その代謝産物 や上皮細胞との直接的な接触を通して、宿主の健康に大 きな影響を与える (Kau et al., 2011). 腸内細菌叢の組成 は時間とともに変化するが、最も大きな変化が見られる のは授乳開始時と終了時である(Yatsunenko et al., 2012). 最近の研究では、乳児期における腸内細菌叢形 成が宿主の健康に長期的な影響を与えることが指摘され ているため (Cox et al., 2014; Olszak et al., 2012), 乳児期 の腸内細菌叢がどのように形成されるかを理解すること は非常に重要である。ビフィズス菌はヒト腸内に最初に 定着する腸内細菌として知られており、一般に母乳で育 てられた乳児では総細菌数の50%以上(多くの場合 70%以上)を占めている (Matsuki et al., 2016; Tannock et al., 2013; Yamada et al., 2017). ビフィズス菌の豊富さ, すなわち占有率の高さは、下痢、アレルギー、およびア トピー性皮膚炎の発症率と逆相関することが知られてお り (Di Gioia et al., 2014; Kalliomäki et al., 2001), さらに, 抗腫瘍免疫の活性化 (Saavedra et al., 1994), 血清コレス テロール値の低下 (Beena & Prasad 1997). および葉酸 の供給量の増加 (Scholz-Ahrens et al., 2001) といった効 果も明らかにされている.したがって、ビフィズスフロー ラの形成は、生涯にわたってヒトの健康に好影響を与え ることが考えられる.

ヒト母乳オリゴ糖(HMO)は、人乳に含まれる3糖 以上のオリゴ糖の総称で、乳糖および脂質に次いで3番 目に豊富な固形成分である。 膵消化酵素に対して耐性を 示すために、乳児にとっての栄養にはならないが (Kunz et al., 2000; Urashima et al., 2012), それにもかかわらず 母親は乳腺で多大なエネルギーを消費して HMO を産生 する(理論上1回のグリコシルトランスフェラーゼ反応 には1分子のATPが必要とされる). それには何らかの 生理的意義があって然るべきである. これまでに、我々 を含むいくつかの研究グループが、乳児型ビフィズス菌 である Bifidobacterium breve, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum subsp. longum (B. longum), B. longum subsp. infantis (B. infantis) ($\pm h \ltimes B$. pseudocatenulatum が含まれることもある)がHMOs 分解に必 要な酵素をコードする遺伝子群を持つことを報告してい る (Garrido et al., 2016; James et al., 2016; Katayama 2016; Matsuki et al., 2016; Sela et al., 2008). 腸内細菌種におい て、これらのHMOs分解酵素の存在は基本的に上記ビ フィズス菌種に限定されているため (Katayama 2016; Ruiz-Moyano et al., 2013; Thomson et al., 2017), HMOs はこれらの細菌にとっての選択的栄養源になっている可 能性が高い.実際、我々は最近、B. longumの重要な

HMO 分解酵素であるラクト-N-ビオシダーゼ(LnbX) をコードする遺伝子が、混合乳栄養児と比較して完全母 乳栄養児の便中で優位に濃縮されていることを明らかに した(Yamada et al., 2017). B. longum における lnbX の 存在は株依存的であり、ゲノム配列が決定された B. longum 株のうち本遺伝子を持つ株が半分以下であるこ とを考慮すると、この結果は、HMOs が腸内における 選択圧として作用していることを強く示唆している.

乳児型ビフィズス菌は、HMOsを分解するために2つ の異なる戦略を発達させてきた (Katayama 2016). 一つ 目は細胞外グリコシダーゼ依存的な戦略,二つ目はトラ ンスポーター依存的な戦略である.前者の場合,HMOs は細胞壁に結合した分泌型グリコシダーゼによって細胞 外で加水分解され、その後、遊離した単糖類および二糖 類が細胞内に取り込まれる.後者では、3糖以上のオリ ゴ糖はATP 結合カセット(ABC) トランスポーターに よって細胞に直接取り込まれ、エキソグリコシダーゼに よって細胞内で加水分解される.乳児型ビフィズス菌に おける HMOs 分解経路の理解はまだ完全ではないが. B. bifidum と LnbX 陽性の B. longum は細胞外グリコシダー ゼを利用する前者に属するのに対し, B. breve, B. infantis, および LnbX 陰性の B. longum はトランスポー ターに依存するタイプである (Odamaki et al., 2015). 以 前の研究において我々は、4種の乳児型ビフィズス菌を HMOs培地で培養した際の上清中の分解物を分析する ことで、これらのビフィズス菌がゲノム配列や酵素機能 から予想した通りのグリコシダーゼとトランスポーター を使用してHMOsを資化していることを明らかにした (Asakuma et al., 2011). この過程で、興味深いことに、 細胞外グルコシダーゼ依存的な HMOs 分解様式を持つ B. bifidum JCM 1254 株は、理論上すべてのタイプの HMOsを資化することが出来るにもかかわらず、増殖途 中でHMOs 分解物の一部を消費せずに培地中に残した ままにすることを見出した.具体的には、対数増殖期初 期の培養上清中に、ラクト-N-テトラオース(LNT: Gal β1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc, 最も豊富な HMO コア構造) からラクト-N-ビオシダーゼ(LnbB)によって産生さ れるラクト-N-ビオースI(LNB: Galβ1-3GlcNAc)およ びラクトース(Lac:Galβ1-4Glc)が大量に検出される ことを見出した.加えて、ガラクトース(Gal)は培養 期間全体を通して検出され、定常期の終期においても消 費されないまま残されていた. LnbX 陽性の B. longum JCM 1217 株も Lac を一時的に培養液中に放出していた. これらの結果は、HMOs 分解物である LNB、Lac、およ び Gal が.他種ビフィズス菌に共有される可能性を示し ていた (Asakuma et al., 2011; Katayama 2016). 特に, LNB 資化にはガラクト-N-ビオース (GNB) / ラクト

-*N*-ビオースI(LNB)トランスポーターと細胞質ホス ホリラーゼ(GNB/LNBホスホリラーゼ)が必要であ るが(Kitaoka *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2010), これらの遺 伝子は4種の乳児型ビフィズス菌 *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, および *B. infantis* が特異的に有していること が知られている(Xiao *et al.*, 2010).

Tannock et al., (2013) は母乳栄養児の腸内細菌叢中で B. bifidum がある程度以上検出される場合は, ビフィズ スフローラ形成率が高くなることを報告した.興味深い ことに,これは母乳栄養児の糞便にのみ見られる現象で, 人工乳栄養児の糞便においては見られなかった.これら の結果も,やはり,ビフィズス菌群集内で B. bifidum に よって産生された HMOs 分解物のクロスフィーディン グが起こっている可能性を示唆していた.

そこで本研究では、乳児糞便から単離した B. bifidum の4株を用いて、ビフィズス菌コミュニティー内のクロ スフィーディングの可能性を検討することとした.まず, これらの株をHMOs 培地で培養し、その上清中に遊離 する HMOs 分解物を分析することによって、それぞれ の株のHMOs 資化能を分析した.次に, B. bifidum によ る B. longum への HMOs 分解物の供給(クロスフィー ディング)について,共培養実験を行うことで検証した. さらに、HMOsを炭素源として糞便懸濁液を培養し、 その際に4株のB. bifidumの添加が他種ビフィズス菌の 増殖を促進する可能性について検討した. B. bifidum の 2株については全ゲノム配列も決定した. その結果, B. bifidum は HMOs 分解物のクロスフィーダーとして利他 的な性質を有していることを見出した.本研究の成果は. 母乳栄養児の腸内でどのようにしてビフィズスフローラ が形成されるかを考える上で、また、ビフィズスフロー ラ形成を促すためのヒト介入試験を行う上で重要な情報 を提供することにつながる.

実験方法

試薬

2'-フコシルラクトース (2'-FL: Fuca1-2Galβ1-4Glc), 3-フコシルラクトース (3-FL: Galβ1-4 (Fuca1-3) Glc), ラクト-*N*-ネオテトラオース (LN*n*T: Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), ラクト-*N*-フコシルペンタオース I (LNFP I: Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc), およびラク ト-*N*-ジフコシルヘキサオース II (LNDFH II: Galβ1-3 (Fuca1-4) GlcNAcβ1-3Galβ1-4 (Fuca1-3) Glc) は Dextra Laboratory (Reading, UK) から, ラクト-ジフコテト ラオース (LDFT: Fuca1-2Galβ1-4 (Fuca1-3) Glc) およ びラクト-*N*-テトラオース (LNT: Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc) は Isoprep (Tullinge, Sweden) から購入, もしくは Glycom (Denmark) から恵与, ラクト-*N*-フコ シルペンタオース II (LNFP II: Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) およびラクト-*N*-ジフコシルヘキサオー ス I (LDFH I: Fuc α 1-2Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) は Carbosynth (Berkshire, UK) から, デオキシフコノジリマイシン (DFJ) は Sigma-Aldrich (MO, USA) から, イソマルトペンタオース (IMP) は 生化学工業 (Tokyo) から購入した. LNB は以前の報 告に従って合成した (Nishimoto and Kitaoka 2007b). 2-アミノアントラニル酸 (2-AA) およびシアノ水素化ホ ウ素ナトリウムは, ナカライテスク (Kyoto) から入手し た. 他の全ての試薬は分析用グレードのものを使用した.

菌株と培養条件

本研究で使用した菌株は, B. bifidum JCM 1254 株, JCM 7004 株、TMC 3108 株、および TMC 3115 株と、B. longum 105-A株およびそのラクト-N-ビオシダーゼ遺伝 子欠損株 △lnbX である. B. bifidum JCM 1254 株と JCM 7004株は理研バイオリソースセンター(JCM)から購入, TMC 3108株とTMC 3115株は幼児糞便から以前に単離 されたものである (Harata et al., 2010). B. longum 105-A株 は京都薬科大の加納康正先生から頂いた (Matsumura et al., 1997: Kanesaki et al., 2014). AnaeroPack システム (Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo) を用いて嫌気性条 件下, GAM 培地 (Nissui, Tokyo) で培養した. 特定 の糖を添加した培地での増殖を調べる場合、基本培地 (0.2%酵母エキス, 1.0%ペプトン, 0.5%酢酸ナトリウ ム. 0.2%クエン酸二アンモニウム. 0.02%硫酸マグネ シウム, 0.2%リン酸水素二カリウム, および0.1%シス テイン塩酸塩)を用いた.植菌前に4%還元剤(2%シ ステイン塩酸塩および11%炭酸ナトリウム)および1% の糖を添加した. 増殖はOD₆₀₀を測定することによって, またはCFUを測定することによってモニターした. デー タは平均値 ± 標準偏差(SD)として示した.

全ゲノム配列決定

B. bifidum JCM 7004 株 およびTMC 3115 株より, Wizard DNAゲノム精製キット(Promega, WI, USA) を用いてゲノム DNAを抽出し, PacBio RS II シークエ ンサー(Pacific Biosciences, CA, USA)を用いてそれ ぞれ540 倍および260 倍のカバレージで配列を決定し, SMART分析ソフトウェアv2.3.0を用いて配列を再構築 した. さらに, HiSeq により追加の配列決定を行い, ギャップ部分を修復した.配列決定および分析は, TaKaRa Bio の Dragon Genomic Center (Shida), Eurofins Genomics (Tokyo),およびBeijing Genomics Institute (Guangdong, China) にて行った.Glimmer3 (Delcher *et al.*, 2007)を使用してオープンリーディング フレームを予測し, KAAS (Moriya *et al.*, 2007)によって KEGG データベース (Kanehisa *et al.*, 2017)に基づいた アノテーションを行った.

PCR 産物の直接シークエンシング

B. bifidum TMC 3108株のゲノム DNA をテンプレート とし, HMO 分解酵素をコードする遺伝子を PrimeSTAR Max (TaKaRa Bio) を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅した. 増幅断片を精製した後, Eurofins Genomics に依頼してプライマーウォーキング法により 配列決定を行った.

人 乳からの HMOs の 調 製

HMOは、以前の報告に従い人乳から精製した (Asakuma et al., 2011).人乳は、長尾助産院(Kyoto) において、採取前の1ヶ月間に抗生物質を服用していない14人の健康な日本人の母親から回収した.インフォー ムド・コンセントはすべての母親から得られている.

培養上清中の糖濃度分析

培養上清中の単糖およびオリゴ糖は、蛍光標識後に高 速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分析した. HMO存在下でインキュベートした培養液から50µlを採 取し、遠心分離により上清を回収して-20℃で保管し た. ラベル化の際は、上清を解凍して直ちに30µ1の水 および 20 µl の 0.1 % IMP (内部標準) と混合した.次い で、試料中の糖を以前の報告に従い2-AAで標識した (Asakuma et al., 2011). 種々の糖のうち LNB は熱によ り自発分解するため、本論文中に結果として記載されて いる濃度は本来の濃度の半分以下になっている. TSKgel Amide-80 HR カラム $(4.6 \times 250 \text{ mm}, \varphi = 5 \mu \text{m})$ (Tosoh, Tokyo)を用いて、65℃で分析を実施した. カラムを 85%溶媒A(アセトニトリル)/15%溶媒B(100mM ギ酸アンモニウム緩衝液, pH4.3) で平衡化し, 溶出は 流速1mL/分で90分間,溶媒Bのグラジエント(15% から45%) にて行った. 標識した糖は Waters 2475 蛍光 検出器を用いて, 励起 330 nm および蛍光 420 nm で検出 した. 糖濃度は、同様に標識した標準糖を用いて作成し た検量線で決定した.得られたデータを内部標準により 補正し, 平均値 ± 標準偏差(SD)として示した.

B. longum と B. bifidum の in vitro 共培養

クロラムフェニコール耐性遺伝子が組み込まれたプラ スミド (pBFS38) (Sakanaka *et al.* 2014) を保持する *B. longum* 105-A WT株を, *B. bifidum* JCM 1254の存在下 および非存在下で,炭素源として1% HMO を添加した 基本培地中で培養した.経時的に培養液をサンプリング, 希釈して,抗生物質含有($2.5\mu g/mL$ クロラムフェニコー ル)もしくは非含有 GAM プレート上に塗布した.クロ ラムフェニコール含有プレート上に形成されたコロニー は B. longum, 非含有プレート上のコロニーは B. longum と B. bifidum 由来の合計として計算した.HMO 培地中における B. bifidum 存在下で, B. longum 105-A $\Delta lnbX$ 株を,WT株と競合させる場合は,pBFS38と pBFO2(Sakanaka et al. 2014)をそれぞれ $\Delta lnbX$ 株と WT株に導入して区別した.経時的にサンプリング,希 釈して抗生物質含有 GAM 寒天プレート($30\mu g/mL$ ス ペクチノマイシンあるいは $2.5\mu g/mL$ クロラムフェニ コール)上に塗布し,CFUを算出した.

糞便試料培養

糞便試料は、1人の健康な日本人乳児(乳児C:4ヵ 月齢/帝王切開分娩/女児)と2人の健康な日本人幼児 (幼児A:4歳/女児,幼児B/5歳/男児)から両親の 同意を得たうえで採取した.2人の健康な日本人の成人 (成人D:30歳/男性,成人E:39歳/男性)も本人の 同意を得て採取を行った、採取した試料は嫌気性条件下 で保存し、嫌気性チャンバー (InvivO2 400; Baker Ruskinn, Bridgend, UK) 中で20%グリセロールに懸 濁し、使用するまで-80℃で保存した。解凍した糞便 試料 A~Eを,炭素源として1% HMOs またはグルコー ス(Glc)を含む基本培地1mLに接種して培養した. 接種後0時間の幼児A, 幼児B, 乳児C, 成人D, およ び成人Eの試料中の総菌数は16SrRNA遺伝子コピー数 で推定し、それぞれ 7.9×10⁸、3.2×10⁹、4.4×10⁹、1.7 ×10¹⁰,および1.7×10¹⁰ copies/mLであった.DFJ を添 加する場合は終濃度500µMとした.24時間インキュベー トした後、培養液を遠心分離し回収した菌体を1mLの TE 緩衝液(1mM EDTA 含有 10mM Tris-HCl, pH 8.0) に再懸濁した. 懸濁液をステンレスビーズ (φ=5.0mm) およびジルコニアビーズ (φ=0.1mm, 100 μL容量に相当) を入れた2mLのスクリューキャップ付チューブに移し た後,シェイクマスターネオ (Biomedical Science, Tokyo)にて, 1,500 rpm で 10 分間振盪破砕した.次いで, 破砕液からフェノール/クロロホルム法により全 DNA を抽出した. SYBR Green システム (TaKaRa Bio) を用 い, 各試料中の B. bifidum (種レベル) と Bifidobacterium (属レベル)の量を, 16S rRNA 遺伝子の qPCR 分析によっ て定量した.結果は3回の実験の平均値 ± 標準偏差 (SD) として示した. ビフィズス菌の占優率は, ビフィ ズス菌の 16S rRNA 遺伝子数(B. bifidum を除く)を総 細菌 16S rRNA 遺伝子数で割ることによって算出した. プライマーは, B. bifidum 種 レベル (Tannock et al.,

2013) と Bifidobacterium 属 レベル (Yamada et al., 2017) のものを使用した. 培養上清の pH は, マイクロ pH メー ター (HORIBA, Kyoto) で測定した. また, TLC 分析 では, シリカゲル 60 アルミニウムシート (Merck, Darmstadt, Germany) を用い, 1-ブタノール: 酢酸: 水 (2:1:1) 溶液にて展開後, 呈色試薬 (Anderson et al., 2000) を用いて可視化した.

統計分析

統計分析は, BellCurve バージョン 2.00 (SSRI, Tokyo) および Excel 2013 (Microsoft) ソフトウェアを用い, Dunnett 検定 (多重検定)を行った. この際, p 値が 0.05 未満の場合に有意な差であると見なした.

画像作成

ゲノム構造はRパッケージの"circlize"ライブラリー を用いて作図した.

倫理的配慮

本研究は,京都大学(R0046),滋賀県立大学(71-3), 石川県立大学(2016-2)の倫理委員会の審査・承認を 受け,ヘルシンキ宣言に基づいて実施した.乳児糞便は 母親の同意を得て,それ以外は全ての被験者からイン フォームド・コンセントを得た上で解析に使用した.

データ登録

B. bifidum JCM 7004株およびTMC 3115株の全ゲノム配列は, accession number AP018131 および AP018132 で DDBJ より入手可能である.

結 果

HMOs存在下における B. bifidum の増殖

乳児糞便から単離された4株の*B. bifidum*を, HMOs を炭素源として含む培地中で培養した. 比較のために Lac含有培地でも同様に培養した. その結果, 4株とも HMOsとLacを良好に資化することが分かった(15時 間以内にOD₆₀₀>0.5). なお, HMOs含有培地においては, JCM 1254 株, TMC 3108 株, およびTMC 3115 株 が JCM 7004 株よりも高い増殖能を示した.

B. bifidum JCM 7004株およびTMC 3115株の全ゲノム 配列決定

B. bifidum JCM 1254 株のドラフトゲノム配列 は, GeneBankデータベース (accession number BBBT00000000)から入手可能である.本研究において は, JCM 7004 株およびTMC 3115 株の完全ゲノム配列 を決定した(Fig.1). これら2株を選択したのは、ムチ ン糖鎖を資化する株であることが報告されているためで ある(未発表データ). JCM 7004 株の染色体の長さは 2,261,666 bp で, 2,106 の コード領域(CDS), 57 の tRNA 遺伝子,および3つのrRNAオペロンを含むと予 測された. TMC 3115 株の染色体は2,178,894 bp で,1,876 のCDS,53 のtRNA 遺伝子,および3つのrRNAオペロ ンを含むと予測された. ゲノムの平均 GC 含量はそれぞ れ 62.6 % と 62.8 % であった.すでに明らかにされてい る7 株の *B. bifidum* ゲノム配列の中で,JCM 7004 株の ゲノムサイズが最大である一方,TMC 3115 株のものは 最小であった.

Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) における解析では、JCM 7004 株の 2,106 の CDS のうち 932 遺伝子に、TMC 3115 株の 1,876 の CDS のうち 905 遺伝子に機能が割り当てられた. これら遺伝子のうち 10%以上が炭水化物代謝に関与していると予測された. 糖質関連酵素 データベース (http://www.cazy.org/) (Lombard *et al.*, 2014)に基づく分析によると (Yin *et al.*, 2012)、JCM 7004 株および TMC 3115 株は、それぞれ 40 個および 39 個のグリコシダーゼファミリードメイン を含んでいた. *B. bifidum* ゲノム中に宿主由来糖鎖に作 用するグリコシダーゼが豊富に含まれることは、以前に も指摘されている (Turroni *et al.*, 2010).

B. bifidum における HMOs 分解酵素の保存性

これまでの研究で JCM 1254 株における HMO 資化に は、6つの細胞外酵素、1つのトランスボーター、およ び1つの細胞内ホスホリラーゼが関わることを明らかと している.1,2-α-L-フコシダーゼ (AfcA) (Katayama *et al.*, 2004)、1,3-1,4-α-L-フコシダーゼ (AfcB) (Ashida *et al.*, 2009)、ラクト-*N*-ビオシダーゼ (LnbB) (Wada *et al.*, 2008)、β-1,4-ガラクトシダーゼ (InbB) (Wada *et al.*, 2008)、β-1,4-ガラクトシダーゼ III (BbpIII)、 β-1,3-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ I (BbhI) (Miwa *et al.*, 2010)、およびシアリダーゼ II (Kiyohara *et al.*, 2011) は、HMOs に見られる全てのグリコシド結合を単 糖 (Fuc, Gal, Glc, *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、 および*N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)) および二 糖 (Lac および LNB) に分解する分泌型酵素である.

LnbBによって遊離したLNBは、GNG/LNBトランス ポーターによって細胞に取り込まれ(Asakuma *et al.*, 2011), その後GNB/LNBホスホリラーゼ(GLNBP) によってガラクトース-1-リン酸とGlcNAc/GalNAcに加 リン酸分解され(Nishimoto & Kitaoka 2007a), ビフィズ ス経路に入る(Suzuki *et al.*, 2010). Lac はBbgIIIによっ て加水分解されるか, またはLacパーミアーゼによって 輸送される(Miwa *et al.*, 2010; Parche *et al.*, 2006). これ



Fig. 1. The genomic structure and gene functions (KEGG Orthology) of *B. bifidum* JCM 7004. The genome structures were depicted using the R package "circlize". This figure is modified from Figure 2 of Gotoh *et al.*, (2018). Sci. Rep., 8:13958.

らの6つの酵素 AfcA, AfcB, LnbB, BbgIII, BbhI, GLNBP, および GNB/LNBトランスポーターは, 全 HMOsで90%以上を占める中性 HMOs (Urashima *et al.*, 2012)を完全消化するために必要な最小セットである.

ゲノム解析から, JCM 7004 株および TMC 3115 株が, HMO 分解酵素の最小セット全てを含むことが明らかと なった. TMC 3108 株についても, PCR 産物の配列決定 から, これらの遺伝子を有することが分かった.

4株間の7つの酵素のアミノ酸配列の同一性は非常に 高く(97.3~100%),結晶構造が解明されている酵素 (AfcA, AfcB, LnbB, GNB/LNBトランスポーター基 質結合タンパク質(GLBP),およびGLNBP)において, 基質認識および触媒作用に関与するアミノ酸残基は完全 に保存されていた.ゲノム配列が報告されている他の5 つの B. bifidum 株も、これら酵素セットを98.1%以上の 同一性で保有していた.唯一の例外はJCM 1255株の GLBPであり、フレームシフト変異が導入されていた. これはこの株が HMOs 培地で増殖能が低い要因である と推察される. B. bifidum 種レベルにおける HMOs 分解 酵素の高い保存性は,他の乳児型ビフィズス菌種とは大 きく異なる点であり, B. longum, B. infantis,および B. breve では,HMO 分解酵素をコードする遺伝子の保存 性は,GNB/LNB トランスポーターおよび GLNBP を除 いて多くの場合,株依存的である (Garrido et al., 2016; Matsuki et al., 2016; Odamaki et al., 2015; Ruiz-Moyano et al., 2013; Thomson et al., 2017; Yamada et al., 2017).

B. bifidum の HMOs 資化様式

B. bifidumにおける上記7遺伝子の役割を検証するために、HMOs培地中で培養した4株の上清中の糖組成および濃度変化を分析した(Fig.2). その結果、HMOsの 消費様式は4つの株で非常に類似していることが明らかになった.また、その消費様式は我々の以前の報告とも 類似していた(Asakuma *et al.*, 2011). すなわち、HMOs



Fig. 2. In vitro HMO consumption behavior of four B. bifidum strains. Each strain was cultured in HMO-supplemented basal medium, and the samples were collected at the indicated time points. The sugars in the culture supernatants were labelled with 2-AA and analyzed by normal phase HPLC. LNB concentration was not accurately determined due to its heat lability. Concentrations of (a) penta- and hexasaccharides (LNFP I, LNFP II/III, LNDFH I, and LNDFH II), (b) tetrasaccharides (LNT, LNnT, and LDFT), (c) di- and trisaccharides (2'-FL, 3-FL, Lac, and LNB), and (d) monosaccharides (Fuc, Gal, Glc, and GlcNAc) are shown.

の主成分である LNT および 2'-FL の分解は細胞が対数増 殖期に入る前に始まり、また、これらの2つの基質の大 部分は対数増殖期初期でほぼ全て分解され、結果として LNB および Lac の一時的な増加(それぞれ少なくとも 0.3mM, 1.9mM) が観察された. このことは, LnbB と AfcA が速やかに機能していることを示唆している (Ashida et al., 2009; Katayama et al., 2004; Sakurama et al., 2013; Wada et al., 2008). Gal は LNnT および Lac か ら BbgIII によって遊離され、増殖期間を通して培地中 で検出された. Glc 濃度は JCM 7004 株を除いて低いま まであった. JCM 7004 株で Glc 消費能が低いのは. 他 の3株に比べて増殖能が低かったことと関連していると 思われる. GlcNAc は検出されなかった. 3-FL, LDFT, LNFP II/III, および LNDFH I/IIの α -(1→3/4) -フコシ ル結合はAfcBによって加水分解されるが、3-FLおよび LNDFH I の分解速度が遅いのは、AfcA と比較して AfcB の触媒活性が低いことに起因すると考えられる (Sakurama et al., 2012). これらの結果は, 培養上清中 へのHMOs分解物(LNB, Lac, Gal, およびFuc)の 放出が, B. bifidum 固有の性質であることを示している.

B. bifidum による B. longum への HMOs 分解物のクロス フィーディング

HMOs分解物のクロスフィーディングの可能性を調べるために, B. bifidum の afcA または lnbB 遺伝子を破壊することを試みたが,遺伝子欠損株の取得には至らなかった. そこで, HMOs 添加培地中において, B.

longum 105-A株および B. bifidum JCM 1254 株の共培養 試験を行った. B. longum 105-A (lnbX 陽性)の野生型 株 (WT)は、単独培養では HMOs 培地中での増殖能 は低かったが, B. bifidum と共培養すると増殖が著しく 促進された (Fig.3).次に, B. bifidum 共存下において B. longum 105-A WT と Δ lnbX 株の増殖競合実験に行ったと ころ、両者の増殖には差が見られなかった.このことか ら、lnbX 遺伝子は B. longum が B. bifidum によって産生 された HMOs 分解物を利用するのに必要ないことが明 らかとなった. B. longum Δ lnbX 株は単独培養では LNT を資化することができなかったが, B. longum WT (LnbX 陽性)との共培養条件下ではよく増殖した (Yamada et al., 2017).このような種間・種内レベルのクロスフィー ディングは、実際の腸内細菌叢群集内においても起こり 得ることが示唆された.

HMOs を添加した糞便懸濁液中における *B. bifidum* の他 のビフィズス菌の増殖への影響

*B. bifidum*によって産生された HMOs 分解物が,実際 の複雑な生態系において他種ビフィズス菌に共有される かどうかを調べるために,1名の乳児(C),2名の幼児 (AおよびB),および2名の大人(DおよびE)から回 収した糞便試料を用いて共培養実験を行った.幼児A, 幼児B,乳児C,成人D,および成人Eの糞便試料中の *Bifidobacterium* 属細菌 16S rRNA 遺伝子の初期(培養 0 時間) コピー数は,それぞれ 1.0×10⁸,4.7×10⁸,3.1× 10⁴,1.1×10⁹,および 3.9×10⁹ copies/mL であった.*B.*



Growth of *B. longum* in HMOs-supplemented medium

Fig. 3. Inter-species cross-feeding of HMO degradants. The wild-type strain of *B. longum* 105-A with pBFS38 (Cam^R) was grown in basal medium supplemented with 1 % HMOs in the absence (left panel) and presence (right panel) of *B. bifidum* JCM 1254. The samples were taken at the indicated time points, and CFUs were determined by spreading the cultures on Cam-containing (for *B. longum* cells) and not containing (for *B. longum* + *B. bifidum* cells) plates. This figure is modified from Figure 4 of Gotoh *et al.*, (2018). Sci. Rep., 8:13958.

bifidum の 16S rRNA 遺伝子のコピー数については,成 人Dを除いて検出限界未満(<4.0×10⁴ copies/mL)で あった. 糞便懸濁液を4種のB. bifidumの存在下または 非存在下で.1% HMO を添加した培地中で24 時間培養 した後, 16S rRNA 遺伝子数を測定した (Fig.4). その 結果, B. bifidum の添加は, 成人 E および TMC 3115株 を添加した幼児Bの場合を除いて, B. bifidum 以外の他 種ビフィズス菌の増殖を促進していた. この増殖促進効 果は、15 例中10 例で統計的に有意 (p<0.05, Dunnett 検定)であった.幼児Aの試料において観察された他 種ビフィズス菌増殖促進効果は、B. bifidum を添加しな かったコントロールと比較して、JCM 1254株、JCM 7004株, TMC 3108株, および TMC 3115株それぞれで 60, 130, 290, および 990 倍であった. 幼児 B 試料では, JCM 1254 株, JCM 7004 株, および TMC 3108 株それぞ れで2.5, 1.6, および1.7倍であった。特に、幼児C試 料の場合は, B. bifidum を添加することにより 1,700 倍 から10,000倍の増加が見られたが、成人D由来試料で は1.4倍から14倍の増加であった.他種ビフィズス菌 の増殖促進効果は特に幼児Aおよび乳児Cの試料にお いて顕著であったが、両試料を B. bifidum 非添加条件で 24 時間培養した際は B. bifidum の 16S rRNA 遺伝子は検 出されなかった(すなわち,元々に試料にB. bifidumが 含まれていなかった). 一方で, 幼児B, 成人D, 成人E の糞便試料では24時間培養後にB. bifidum が検出された (それぞれ 1.8×10^{6} , 3.1×10^{9} , および 1.5×10^{7} copies/mL. この結果は、後者3つの糞便試料には、元々のB. bifidum が含まれていたことを示している. 培養上清を TLC分析したところ、幼児Aおよび乳児Cの試料のB. bifidum 非添加条件では、2'-FL、LNFP I、LNDFH I、お よび長鎖 HMOsのスポットが24時間培養後も残ってい たが、B. bifidum を添加して培養した場合ほぼ完全に消 費された.幼児B試料では, B. bifidum 非添加条件にお いてLNDFHIに対応するスポットが検出されたが、B. *bifidum* 添加により消失した. 成人 D および成人 E の培 養上清においては, B. bifidum 非添加および添加いずれ においても,明らかなスポットは検出されなかった.

B. bifidum の添加は、HMOs 消費を促して他種ビフィ ズス菌の菌数を増加させるのみならず、全菌数中におけ るビフィズス菌占有率も同様に上昇させていたことは特 筆に値する (Fig.4).

同様の培養を Glc 含有培地で行ったところ, B. bifidum 添加による他種ビフィズス菌の増殖促進効果は 全くと言って良いほど見られなかった.すなわち, B. bifidum JCM 1254 株および TMC 3108 株をそれぞれ幼児 A および乳児 C 由来の試料に添加した場合にのみ,他種 ビフィズス菌の 16S rRNA 遺伝子コピー数が 5.6 倍およ び9.3 倍増加したが,他の試料や他の添加条件では変化 しないかむしろ減少した.

添加した B. bifidum 自身は,使用した炭素源(HMOs または Glc)にかかわらずよく増殖していた. 糞便試料 を HMOs 培地で培養した場合の最終 pH は中性(6.4~ 7.7)であったが,Glc の場合は5.1~6.1に低下した. 以上の結果より,B. bifidum によって産生された HMOs 分解物が,B. bifidum 自身だけでなく他種ビフィズス菌 にも供給され,それによってビフィズス菌全体の占有率 を上昇させたことが強く示唆された.

考 察

腸内細菌叢の組成は、宿主―細菌間の相互作用だけで なく、細菌―細菌間の相互作用によっても影響を受ける. 腸内における細菌間の競合としては、侵入した病原菌が 増殖あるいは定着するのを防ぐ効果が良く知られている が (Sekirov et al., 2008), 最近の研究ではクロスフィー ディングを含む相互作用が明らかにされ始めている.ク ロスフィーディングは、双方向と単方向のいずれの形で も起こり得るが、双方向クロスフィーディングとしてはイ ヌリンを介した Bacteroides ovatus と Bacteroides vulgatus との作用 (Rakoff-Nahoum et al., 2016) や O-グリカン分 解物とシュードビタミンB₁₀を介したAkkermansia muciniphila と Eubacterium hallii との作用などが報告 されている (Belzer et al., 2017). A. muciniphila と Anaerostipes caccae 間には単方向クロスフィーディング が見られ, A. muciniphila によって産生された酢酸が An. caccaeの増殖を促す(Belzer et al., 2017). また, Faecalibacterium prausnitiiの 増殖に必要な酢酸を Bifidobacterium adolescentis が供給する例も知られてい る (Rios-Covian et al., 2015). このような細菌間での分解 物や代謝物の共有は,腸内細菌叢の多様性を増加させ, 柔軟で健康な腸環境を形成するために重要であると考え られている (Bokulich et al., 2016).

これまでに、我々を含むいくつかの研究グループがビ フィズス菌による HMOs 資化メカニズムの解明に取り 組んできた. その結果, B. infantis, B. longum, B. breve, および B. bifidum に代表される乳児型ビフィズ ス菌が HMOs 資化能を有することが明らかとなった. 興味深いことに、4種は近縁種であるにもかかわらず、 HMOs を分解するために異なる戦略(B. bifidum および LnbX 陽性 B. longum は細胞外グリコシダーゼ依存的, B. breve, B. infantis, および LnbX 陰性 B. longum はトラ ンスポーター依存的)をとっており、HMOs 消費様式 も異なっている. LoCascio et al. (2010) は、B. infantis が ABC トランスポーターと細胞内エキソグリコシダー

HMOs-supplemented medium



	Relative abundance of <i>Bifidobacterium</i> sp. other than <i>B. bifidum</i> in total bacteria (%)				
	None -added	JCM 1254	JCM 7004	TMC 3108	TMC 3115
Child A	0.0050	0.21	0.58	1.0	5.3
Child B	2.6	4.3	3.4	4.9	1.9
Infant C	0.00034	0.27	0.81	1.6	2.0
Adult D	0.37	2.4	2.8	0.43	4.4
Adult E	5.0	3.6	4.4	4.4	3.8

Fig. 4. Exogenous addition of *B. bifidum* to fecal suspensions increases the relative abundance of *Bifidobacterium* (species other than *B. bifidum*) in the culture supplemented with HMOs. Stool suspensions from two children (Child A and B), one infant (Infant C), and two adults (Adult D and E) were cultured in basal medium containing 1 % HMOs with and without the addition of four *B. bifidum* strains for 24 h. The abundance of 16S rRNA gene attributable to *Bifidobacterium* species other than *B. bifidum* were determined by qPCR at 0 h (white bars) and 24 h (striped bars: without the addition of *B. bifidum*, and grey bars: with the addition of *B. bifidum*) post-inoculation. The data are means ± SD of three independents assays. Dunnett's test was used to examine the statistical significance. Relative abundance (%) of *Bifidobacterium* sp. other than *B. bifidum* in total bacterial cells is also shown. This figure is modified from Figure 5 of Gotoh *et al.*, (2018). Sci. Rep., 8:13958.

ゼをコードする 40kb の遺伝子クラスターを獲得したこ とで、ほとんどの HMOs 分子を消費可能となったと報 告している. B. bifidum も HMOs 資化能が高く,本研究 ではこの表現型が B. bifidum おいて高度に保存された HMOs 分解酵素に起因していることを明らかとした. B. *infantis* および B. bifidum とは対照的に, B. breve と B. longumは限られたHMOs分子種のみしか資化できない. すなわちこれら2種は、LNTを資化することができるが、 他の HMO 分子種の資化能は極めて限定的であることが 知られている (Ruiz-Moyano et al., 2013; Thomson et al., 2017). B. breve 株においてはLNnT, 2'-FL, および/ または3-FLを分解することができる株 (James et al., 2016; Matsuki et al., 2016), B. longum 株ではLNT に加 えて 2'-FL および LNFP I を利用することができる株が いくつか報告されているが、このような例は極めてまれ である (Garrido et al., 2016; Thomson et al., 2017). つ まり,種レベルでみるとB. breve およびB. longumの HMOs 資化能は, B. infantis および B. bifidum と比較し てかなり限定的である. それにもかかわらず, 乳児の腸 内細菌叢内では, B. breve や B. longum が優占種である 場合が多い (Matsuki et al., 2016). つまり、母乳栄養児 の腸におけるビフィズスフローラ形成は、種や株ごとの HMOs資化能によってのみ単純に説明することは出来 ない。

上述した通り,以前の研究において我々は B. bifidum JCM 1254 株が HMOs 分解物の一部を消費しないまま培 地中に残したままにすることを明らかとした.一方, Tannock らは、母乳栄養児の糞便における B. bifidum の 存在とビフィズスフローラ形成率の間に正の相関がある ことを報告している (Tannock et al., 2013).これらの知 見は、B. bifidum による他種ビフィズス菌への HMOs 分 解物のクロスフィーディングの可能性を示唆していた.

我々は本研究において、4株の B. bifidum すべてが培 養中に HMOs 分解物を残したままにすることをまず示 し,次にビフィズス菌の種間および種内において HMOs 分解物のクロスフィーディングが起こっていることを明 らかとした.すなわち, B. longum は B. bifidum と共培 養した場合にのみ HMOs 培地中で高い増殖能を示した. また、ラクト-N-ビオシダーゼ遺伝子を欠損させた B. longum ΔlnbX 株は LNT を資化できなかったが、WT 株 と共培養した場合は、LNT 培地中で良好に増殖した. これらの結果を基として、より複雑な生態系、すなわち 糞便試料を用いた実験を行った.その結果、B. bifidum を HMOs を含む糞便懸濁液に加えると、他種ビフィズ ス菌の生育が促進されることが明らかとなった(成人 E 試料を除く).また、幼児 A、幼児 B、および乳児 C 由 来試料を B. bifidum と共培養した場合、B. bifidum 非添 加条件では消費されずに残っていた HMO 分子種が消失 していた. B. bifidum による他種ビフィズス菌の増殖促 進効果は、HMOs 培地においては見られたが、Glc 培地 ではほとんど観察されなかった.興味深いことに、 HMOs 培地中で24時間培養した後の試料B, D, およ びEにおいては, B. bifidum 非添加条件であってもB. bifidum が検出され、一方試料AとCでは検出されなかっ た. B. bifidum による他種ビフィズス菌の増殖促進効果 が. 試料 B. D. および E よりも 試料 A および C におい て顕著であったことを考慮すると、元々の糞便中にB. *bifidum* が存在していた B. D. および E では、培養時 に外部から添加した B. bifidum の効果が表れにくかった と推察される. 帝王切開分娩で生まれた離乳前乳児であ る乳児Cでは. B. bifidum を添加した HMOs 培地での培 養によって、ビフィズス菌数と占有率が大幅に増加した ことも注目すべき点である.

HMOs分解物のクロスフィーディングにおけるα-フ コシダーゼ阻害剤 DFJ (Sakurama et al., 2012)の影響を 幼児Aの試料を使用して調べたところ, DFI 添加によっ て B. bifidum による他種ビフィズス菌の増殖促進効果が 消失した. また. その際の培養上清には. 2'-FL. LNFP I,およびLNDFH Iが消費されずに残っていた.この結 果は、フコシル化 HMOs の分解が DFJ によって阻害さ れたために引き起こされたと考えられる. したがって, B. bifidum の細胞外グリコシダーゼによる HMOs 分解は, 少なくとも他種ビフィズス菌への単方向クロスフィー ディングに関与していると結論付けて間違いではないと 思われる. もちろん. B. bifidum による未知の代謝産物 が関与している可能性を排除することはできないが、本 研究の結果は、母乳栄養児の腸内におけるビフィズスフ ローラ形成には、B. bifidum (おそらく LnbX 陽性 B. longum も)による HMOs 分解物を介した他種ビフィズ ス菌の増殖促進効果が大きく関与していると推察され る. B. bifidum の利他的な性質は、成人の腸においても 機能している可能性がある. Egan らは B. bifidum によ るムチン糖鎖分解物が B. breve にクロスフィーディング されている可能性を報告している (Egan, et al., 2014a; Egan, et al., 2014b). ムチンは、ヒトの大腸において高 発現している糖タンパク質であり, B. bifidum はその糖 鎖を分解する分泌型グリコシダーゼを有している (Gotoh et al., 2015; Katayama 2016; Katoh et al., 2017). 興味深いことに、ムチン糖鎖とHMOs 分子のグリコシ ド結合は類似しており、本研究で紹介した HMOs 分解 に関わる多くのグリコシダーゼがムチン分解にも利用さ れている (Katayama 2016).

以上をまとめると、本研究においては、B. bifidum に よる HMO 分解様式が種内で良く保存されていることを 明らかにすると共に, 生じた HMOs 分解物が他種ビフィ ズス菌の増殖を促進することを見出した. これらの成果 は, 乳児用調製乳を含むプレバイオティクスやプロバイ オティクスの発展, および乳児腸管におけるビフィズス フローラ形成を促す介入試験を考える上で重要な知見を 提供するものである.

要 約

母乳栄養児の腸管においては一般にビフィズスフロー ラが形成される.近年の研究によって、乳児型ビフィズ ス菌がヒト母乳オリゴ糖(HMOs)の特異的資化経路 を有することが明らかとなったが、ビフィズスフローラ がどのように形成されているかについては解明されてい ない. 興味深いことに、各ビフィズス菌種のHMOs資 化能は、実際の腸内における優占性と相関していない. すなわち, B. longum と B. breve は乳児腸内の優占種で あるが, in vitro 培養における HMOs 資化能は高くない. 一方で, in vitro 培養において HMOs 資化能が高い B. *bifidum* および B. *infantis* は、実際の乳児腸管内では占 有率が低い.このような背景から、本研究ではB. bifidumの利他的性質について検討を加えた.まず, B. bifidum JCM 7004 株および TMC 3115 株の全ゲノム配列 を決定すると共に, B. bifidum 種内において HMOs 資化 に必要な遺伝子セットが高度に保存されていること, ま た, B. bifidum が HMOs を炭素源として増殖中にその分 解物を培地中に残したままにする性質を共通して有する ことを見出した.次に、HMOsを添加した糞便懸濁液 を B. bifidum の存在下で培養することで他種ビフィズス 菌の増殖が促進され、それによりビフィズス菌全体の占 有率が上昇することを見出した. 同時に, B. bifidum 添 加による HMOs 消費の促進も観察された. これらの結 果は、乳児腸管内でビフィズスフローラが形成される過 程で, B. bifidum による HMOs 分解物を介したクロス フィーディングが起こっていることを強く示唆してい る.

本助成で得られた研究成果の報告

 後藤愛那、山田千早,苫米地祐輔,廣瀬潤子,朝隈貞樹, 浦島匡,北岡本光,栗原新,山本憲二,原田岳,何方, 加藤紀彦,片山高嶺. Bifidobacterium bifidum 菌株間にお けるヒトミルクオリゴ糖資化様式および関連酵素の保存 性. 2017.日本農芸化学会2017年度大会.3月.京都.

原著論文

 Gotoh, A., Katoh, T., Sakanaka, M., Ling, Y., Yamada, C., Asakuma, S., Urashima, T., Tomabechi, Y., Katayama-Ikegami, A., Kurihara, S., Yamamoto, K., Harata, G., Hirose, J., Kitaoka, M., Okuda, S. & Katayama, T. 2018. Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. Sci. Rep., **8**:13958.

謝 辞

本研究は,財団法人発酵研究所寄付講座助成および学 術振興会特別研究員奨励費からの助成金を受けて遂行さ れました.

母乳と糞便試料の採取にご協力頂いた長尾助産院(京都)の長尾早枝子先生, *B. longum* 105-A株を提供して 頂いた加納康正博士, LNTを提供して頂いた Glycom A/S社, TMC 3115株について議論して頂いた遠藤明仁 博士に感謝申し上げます.

参考文献

- Anderson, K., Li, S.C. & Li, Y.T. 2000. Diphenylamine-anilinephosphoric acid reagent, a versatile spray reagent for revealing glycoconjugates on thin-layer chromatography plates. Anal. Biochem., 287:337–339.
- Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Ashida, H., Hirose, J. & Kitaoka, M. 2011. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. J. Biol. Chem., 286:34583–34592.
- Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H., Katayama, T. & Yamamoto, K. 2009. Two distinct α-L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. Glycobiology, **19**:1010–1017.
- Beena, A. & Prasad, V. 1997. Effect of yogurt and bifidus yogurt fortified with skim milk powder, condensed whey and lactose-hydrolysed condensed whey on serum cholesterol and triacylglycerol levels in rats. J. Dairy Res., 64:453–457.
- Belzer, C., Chia, L.W., Aalvink, S., Chamlagain, B., Piironen, V., Knol, J. & de Vos, W.M. 2017. Microbial metabolic networks at the mucus layer lead to diet-independent butyrate and vitamin B12 production by intestinal symbionts. MBio, 8:e00770-00717.
- Bokulich, N.A., Chung, J., Battaglia, T., Henderson, N., Jay, M., Li, H., D. Lieber, A., Wu, F., Perez-Perez, G.I., Chen, Y., Schweizer, W., Zheng, X., Contreras, M., Dominguez-Bello, M.G. & Blaser, M.J. 2016. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. Sci Transl Med., 8:343ra82.
- Cox, L.M.M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A. V., Leung, J.M., Cho, I., Kim, S.G., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., Zárate Rodriguez, J.G., Rogers, A.B., Robine, N., Loke, P.P., Blaser, M.J., Zárate Rodriguez, J.G., Rogers, A.B., Robine, N., Loke, P. & Blaser, M.J. 2014. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. Cell, 158:705–721.
- Di Gioia, D., Aloisio, I., Mazzola, G. & Biavati, B. 2014.

Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. Appl. Microbiol. Biotechnol., **98**:563–577.

- Egan, M., Motherway, M.O., Kilcoyne, M., Kane, M., Joshi, L., Ventura, M. & van Sinderen, D. 2014a. Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in a mucin-based medium. BMC Microbiol., 14:282.
- Egan, M., O'Connell Motherway, M., Ventura, M. & van Sinderen, D. 2014b. Metabolism of sialic acid by *Bifidobacterium breve* UCC2003. Appl. Environ. Microbiol., 80:4414–4426.
- Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., Kirmiz, N., Davis, J.C., Totten, S.M., Lemay, D.G., Ugalde, J.A., German, J.B., Lebrilla, C.B. & Mills, D.A. 2016. A novel gene cluster allows preferential utilization of fucosylated milk oligosaccharides in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* SC596. Sci. Rep., **6**:35045.
- Gibson, R.A., Sullivan, T., Prosser, C.G., Lowry, D., Hodgkinson, A.J. 2013. Comparison of the compositions of the stool microbiotas of infants fed goat milk formula, cow milk-based formula, or breast milk. Appl. Environ. Microbiol., **79**:3040–3048.
- Gotoh, A., Katoh, T., Sugiyama, Y., Kurihara, S., Honda, Y., Sakurama, H., Kambe, T., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2015. Novel substrate specificities of two lacto-N-biosidases towards β-linked galacto-N-biose-containing oligosaccharides of globo H, Gb5, and GA1. Carbohydr. Res., 408:18–24.
- Harata, G., He, F., Takahashi, K., Hosono, A., Kawase, M., Kubota, A., Hiramatsu, M. & Kaminogawa, S. 2010. *Bifidobacterium* suppresses IgE-mediated degranulation of rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. Microbiol. Immunol., 54:54–57.
- James, K., Motherway, M.O., Bottacini, F. & van Sinderen, D. 2016. *Bifidobacterium breve* UCC2003 metabolises the human milk oligosaccharides lacto-*N*-tetraose and lacto-*N*-neo-tetraose through overlapping, yet distinct pathways. Sci. Rep., 6:38560.
- Kalliomäki, M., Kirjavainen, P., Eerola, E., Kero, P., Salminen, S. & Isolauri, E. 2001. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. J. Allergy Clin. Immunol., **107**:129–134.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. & Morishima, K. 2017. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. Nucleic Acids Res., 45:D353–D361.
- Kanesaki, Y., Masutani, H., Sakanaka, M., Shiwa, Y., Fujisawa, T., Nakamura, Y., Yokota, A., Fukiya, S., Suzuki, T. & Yoshikawa, H. 2014. Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* 105-A, a strain with high transformation efficiency. Genome Announc., 2:e1311-1314.
- Delcher, A.L., Bratke, K.A., Powers, E.C. & Salzberg, S.L. 2007. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. Bioinformatics, **23**:673–679.
- Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T., Makimura, Y., Hiratake, J., Sakata, K., Yamanoi, T., Kumagai, H. & Yamamoto, K. 2004. Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2-α-L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). J. Bacteriol., 186:4885–4893.
- Katayama, T. 2016. Host-derived glycans serve as selected nutrients for the gut microbe: human milk oligosaccharides and bifidobacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem., **80**:621-632.

- Katoh, T., Maeshibu, T., Kikkawa, K., Gotoh, A., Tomabechi, Y., Nakamura, M., Liao, W.-H., Yamaguchi, M., Ashida, H., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2017. Identification and characterization of a sulfoglycosidase from *Bifidobacterium bifidum* implicated in mucin glycan utilization. Biosci. Biotechnol. Biochem., 81:2018–2027.
- Kau, A.L., Ahern, P.P. & Griffin, N.W., Goodman, A.L. & Gordon, J.I. 2011. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. Nature, 474:327-336.
- Kitaoka, M., Tian, J. & Nishimoto, M. 2005. Novel putative galactose operon involving lacto-*N*-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. Appl. Environ. Microbiol., **71**:3158– 3162.
- Kiyohara, M., Tanigawa, K., Chaiwangsri, T., Katayama, T., Ashida, H. & Yamamoto, K. 2011. An exo-sialidase from bifidobacteria involved in the degradation of sialyloligosaccharides in human milk and intestinal glycoconjugates. Glycobiology, 21:437–447.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. & Strobel, S. 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. Annu. Rev. Nutr., 20:699–722.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M. & Henrissat, B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. Nucleic Acids Res., **42**:D490–495.
- Matsuki, T., Yahagi, K., Mori, H., Matsumoto, H., Hara, T., Tajima, S., Ogawa, E., Kodama, H., Yamamoto, K., Yamada, T., Matsumoto, S. & Kurokawa, K. 2016. A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. Nat. Commun., 7:11939.
- Matsumura, H., Takeuchi, A. & Kano, Y. 1997. Construction of *Escherichia coli-Bifidobacterium longum* shuttle vector transforming *B. longum* 105-A and 108-A. Biosci. Biotechnol. Biochem., **61**:1211–1212.
- Miwa, M., Horimoto, T., Kiyohara, M., Katayama, T., Kitaoka, M., Ashida, H. & Yamamoto, K. 2010. Cooperation of β-galactosidase and β-*N*-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. Glycobiology, **20**:1402–1409.
- Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A.C. & Kanehisa, M. 2007. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. Nucleic Acids Res., 35:W182-185.
- Nishimoto, M. & Kitaoka, M. 2007. Identification of the putative proton donor residue of lacto-*N*-biose phosphorylase (EC 2.4.1.211). Biosci. Biotechnol. Biochem., **71**:1587–1591.
- Nishimoto, M. & Kitaoka, M. 2007. Practical preparation of lacto-*N*-biose I, a candidate for the bifidus factor in human milk. Biosci. Biotechnol. Biochem., **71**:2101–2104.
- Odamaki, T., Horigome, A., Sugahara, H., Hashikura, N., Minami, J., Xiao, J.-Z. & Abe, F. 2015. Comparative genomics revealed genetic diversity and species/strain-level differences in carbohydrate metabolism of three probiotic bifidobacterial species. Int. J. Genomics, 2015:567809.
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M.P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J.N., Siebert, R., Baron, R.M., Kasper, D.L. & Blumberg, R.S. 2012. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. Science, 336:489–493.
- Parche, S., Beleut, M., Rezzonico, E., Jacobs, D., Arigoni, F.,

Titgemeyer, F. & Jankovic, I. 2006. Lactose-over-glucose preference in *Bifidobacterium longum* NCC2705: *glcP*, encoding a glucose transporter, is subject to lactose repression. J. Bacteriol., **188**:1260–1265.

- Rakoff-Nahoum, S., Foster, K.R. & Comstock, L.E. 2016. The evolution of cooperation within the gut microbiota. Nature, 533:255–259.
- Rios-Covian, D., Gueimonde, M., Duncan, S.H., Flint, H.J. & de los Reyes-Gavilan, C.G. 2015. Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. FEMS Microbiol. Lett., 362:fnv176.
- Ruiz-Moyano, S., Totten, S.M., Garrido, D. a., Smilowitz, J.T., Bruce German, J., Lebrilla, C.B. & Mills, D. a. 2013. Variation in consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated strains of *Bifidobacterium breve*. Appl. Environ. Microbiol., **79**:6040–6049.
- Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A. & Yolken, R.H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. Lancet, **344**:1046–1049.
- Sakanaka, M., Tamai, S., Hirayama, Y., Onodera, A., Koguchi, H., Kano, Y., Yokota, A., Fukiya, S. 2014. Functional analysis of bifidobacterial promoters in *Bifidobacterium longum* and *Escherichia coli* using the α-galactosidase gene as a reporter. J. Biosci. Bioeng. 118:489-495.
- Sakurama, H., Kiyohara, M., Wada, J., Honda, Y., Yamaguchi, M., Fukiya, S., Yokota, A., Ashida, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2013. Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of *Bifidobacterium longum* subspecies *longum* shows unique substrate specificity and requires a designated chaperone for its active expression. J. Biol. Chem., 288:25194– 25206.
- Sakurama, H., Fushinobu, S., Hidaka, M., Yoshida, E., Honda, Y., Ashida, H., Kitaoka, M., Kumagai, H., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2012. 1,3-1,4-α-L-fucosynthase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. J. Biol. Chem., 287:16709–16719.
- Scholz-Ahrens, K.E., Schaafsma, G., van den Heuvel, E.G. & Schrezenmeir, J. 2001. Effects of prebiotics on mineral metabolism. Am. J. Clin. Nutr., 73:459S-464S.
- Sekirov, I., Tam, N.M., Jogova, M., Robertson, M.L., Li, Y., Lupp, C. & Finlay, B.B. 2008. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. Infect. Immun., 76:4726–3476.
- Sela, D.A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J.H., Chen, F., Whitehead, T.R., Lapidus, A., Rokhsar, D.S., Lebrilla, C.B., German, J.B., Price, N.P., Richardson, P.M. & Mills, D.A. 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant micro-

biome. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 105:18964-18969.

- Suzuki, R., Katayama, T., Kim, B.-J., Wakagi, T., Shoun, H., Ashida, H., Yamamoto, K. & Fushinobu, S. 2010. Crystal structures of phosphoketolase: thiamine diphosphate-dependent dehydration mechanism. J. Biol. Chem., 285:34279–34287.
- Tannock, G.W., Lawley, B., Munro, K., Pathmanathan, S.G., Zhou, S.J., Makrides, M.,
- Thomson, P., Medina, D.A. & Garrido, D. 2017. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. Food Microbiol., 75:37–46.
- Turroni, F., Bottacini, F., Foroni, E., Mulder, I., Kim, J.-H., Zomer, A., Sánchez, B., Bidossi, A., Ferrarini, A., Giubellini, V., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Fitzgerald, G.F., Mills, D., Margolles, A., Kelly, D., van Sinderen, D. & Ventura, M. 2010. Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107:19514–19519.
- Urashima, T., Asakuma, S., Leo, F., Fukuda, K., Messer, M. & Oftedal, O.T. 2012. The glycobiology of human milk oligosaccharides - The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. Adv. Nutr., **3**:473S-482S.
- Wada, J., Ando, T., Kiyohara, M., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamaguchi, M., Kumagai, H., Katayama, T. & Yamamoto, K. 2008. *Bifidobacterium bifidum* lacto-*N*-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. Appl. Environ. Microbiol., 74:3996– 4004.
- Xiao, J.-Z., Takahashi, S., Nishimoto, M., Odamaki, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. & Kitaoka, M. 2010. Distribution of *in vitro* fermentation ability of lacto-*N*-biose I, a major building block of human milk oligosaccharides, in bifidobacterial strains. Appl. Environ. Microbiol., **76**:54–59.
- Yamada, C., Gotoh, A., Sakanaka, M., Hattie, M., Stubbs, K.A., Katayama-Ikegami, A., Hirose, J., Kurihara, S., Arakawa, T., Kitaoka, M., Okuda, S., Katayama, T. & Fushinobu, S. 2017. Molecular insight into evolution of symbiosis between breast-fed infants and a member of the human gut microbiome *Bifidobacterium longum*. Cell Chem. Biol., 24:515-524.
- Yatsunenko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R. & Gordon, J.I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature, 486:222–227.
- Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F. & Xu, Y. 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. Nucleic Acids Res., 40:W445-451.

ビフィズス菌のフコシルラクトーストランスポーターに見られる 適応進化が母乳栄養児腸管でのビフィズスフローラ形成に関与する 阪中 幹祥,栗原 新,片山 高嶺

石川県立大学生物資源環境学部寄付講座腸内細菌共生機構学 〒921-8836 石川県野々市市末松1-308

Evolutionary traits found in fucosyllactose transporters support symbiosis between bifidobacteria and breast-fed infants Mikiyasu Sakanaka, Shin Kurihara, Takane Katayama

Host-Microbe Interaction Research Laboratory Faculty of Bioresources and Environmental Sciences Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

Recent studies indicate that the human gut microbiota established during infancy has persistent effects on health in later life. Breast-feeding promotes the formation of a bifidobacteria-rich microbiota (bifidus flora) in infant guts, which has been attributed to the ability of infant gut-associated bifidobacteria to catabolize human milk oligosaccharides (HMOs) that are non-digestible sugars contained in breast milk. However, the *in vivo* molecular and physiological basis underlying bifidus flora formation in infant guts remains unclear. Here, we report a comprehensive characterization of two functionally distinct, but overlapping fucosyllactose transporters (FL transporter-1 and -2) from *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*. Faecal DNA and HMO consumption pattern analyses revealed the association of both FL transporters (primarily FL transporter 2) with bifidus flora formation in infant guts. Structural analyses of the solute-binding protein (SBP) of FL transporter-2 complexed with 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose as well as phylogenetic analysis of homologous SBPs revealed the molecular basis of ligand binding, which highlights the expansion of HMO uptake preferences by the gain-of-function mutations in the SBP as a key adaptation strategy of *Bifidobacterium* to the infant gut niche. Our results provide a molecular insight into the HMOs-mediated symbiosis and co-evolution between bifidobacteria and humans.

Key words: ATP-binding cassette transporter, bifidus flora, ecological niche adaptation, human milk oligosaccharides, oligosaccharide uptake

E-mail:

阪中幹祥(miksak@dtu.dk)(現所属: National Food Institute,	小田巻俊孝(森永乳業株式会社基礎研究所)
Technical University of Denmark, Kemitorvet, DK-	杉山友太(京都大学農学研究科)
2800 Kgs. Lyngby, Denmark),	廣瀬潤子(滋賀県立大学人間文化学部)
栗原 新(skurihara@waka.kindai.ac.jp)(現所属:近畿大学生	浦島 匡 (帯広畜産大学畜産学部)
物理工学部 〒 649-6433 和歌山県紀の川市)	清水(肖)金忠(森永乳業株式会社基礎研究所)
片山高嶺(katayama.takane.6s@kyoto-u.ac.jp)(現所属:京都大	北岡本光(農研機構食品研究部門)
学大学院生命科学研究科 〒 606-8502 京都市左京区	吹谷 智(北海道大学大学院農学研究院)
北白川追分町)	横田 篤(北海道大学大学院農学研究院)
共同研究者:	Leila Lo Leggio (Department of Chemistry, University of
Morten Ejby Hansen (Department of Biotechnology and	Copenhagen)
Bioengineering, Technical University of Denmark)	Maher Abou Hachem (Department of Biotechnology and
後藤愛那(京都大学大学院生命科学研究科)	Bioengineering, Technical University of Denmark)
加藤紀彦(京都大学大学院生命科学研究科)	

吉田圭佑 (森永乳業株式会社基礎研究所)

緒 言

母乳栄養児の腸内では、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.これは、ビフィズス 菌が母乳に含まれるオリゴ糖[HMOs (human milk oligosaccharides)]を他の腸内細菌と比較して効率よく 資化できるからと考えられている(Katayama, 2016; Thomson *et al.*, 2018). HMOsは母乳中の固形成分の中 でラクトース(Lac),脂質に次いで三番目に多く (10-20g/L),2'-フコシルラクトース(2'-FL)および 3-フコシルラクトース(3-FL)に代表されるようなフ コシル化オリゴ糖を豊富に含んでいる(Fig.1C参照) (Kunz *et al.*, 2000; Urashima *et al.*, 2012).

これまで, Bifidobacterium longum subsp. longum (B. longum), Bifidobacterium longum subsp. infantis (B. infantis), Bifidobacterium breve および Bifidobacterium bifidum に代表される乳児型ビフィズス菌の HMO 分解 酵素がよく研究されてきた (Katayama, 2016; Thomson et al., 2018). B. bifidum および B. longum のいくつかの株 は、細胞表層に提示された糖質分解酵素を利用して細胞 外でHMOsを分解して利用すると共に.他のビフィズ ス菌種にクロスフィードしている (Gotoh et al., 2018). 一方で、他のビフィズス菌はHMOsを直接に細胞内に 取込み、その後、細胞内でそれらを分解する (Katayama, 2016; Thomson et al., 2018). いずれの場合においても, HMOs または HMO 分解産物を取込むことはビフィズス 菌の乳児腸内での増殖に重要であると考えられるが、ビ フィズス菌のHMO 取込み機構に関する報告は現在のと ころ非常に限られている (Suzuki et al., 2008; Garrido et al., 2016; James et al., 2016; Matsuki et al., 2016; Zúñiga et al., 2018). 当該研究分野の草分け的存在である David Mills らの研究グループは、ゲノム解析および ABC トラ ンスポーターの基質結合タンパク質 (SBP: solutebinding protein)の糖鎖アレイ解析によって, ATP 結合 カセット (ABC) トランスポーターが B. infantis の HMOsの取込みに重要であることを約10年前に明らか にしている (Sela et al., 2008; Garrido et al., 2011). しか しながら、これらの技術で得られた知見や情報は、個々 のトランスポーターの特異性や腸内細菌叢形成における 生理的役割を理解するのに十分とはいえなかった. また 最近, B. longum (Garrido et al., 2016) および B. breve (Matsuki et al., 2016) における 2'-FL や他のフコシル化 HMOs を取込むトランスポーターがゲノム解析を中心 とした解析により同定されているものの、やはり基質特 異性や in vivo での生理的役割はまだ不明な部分が多く 残されていた.

本研究では、B. infantis 由来の二種類のフコシルラク

トース(FL)トランスポーターを包括的に解析すると 共に、それらが母乳栄養児腸内でのHMOsの利用およ びビフィズスフローラ形成にどのように関わっているの かを明らかにした.また、2つのトランスポーターの SBPによる2'-FLおよび3-FLの結合様式を構造学的に 明らかにした.これらの結果を基に、ビフィズス菌が FLトランスポーターを適応進化させることで乳児との 共生を成立させてきたことについて議論する.

実験方法

使用菌株と培養条件

B. longum 105-A (=JCM 31944) は京都薬科大学の加納康正元教授より分譲頂いた. B. infantis JCM 1222^T (=ATCC 15697^T) および Bifidobacterium kashiwanohense JCM 15439^T は理研バイオリソースセンターより入手した. B. infantis JCM 1222^T の遺伝子番号は GenBank アクセッション番号 CP001095.1 に基づいて記載した. ビフィズス菌の培養は、GAM 培地 (Nissui) もしくは 0.34 % (w/v) アスコルビン酸ナトリウム、 0.2 % (w/v) システイン塩酸塩および 2 % (w/v) グルコース (Glc) を添加した MRS 培地 (Becton Dickinson; MRS-CS 培地) を用いて行った. 糖資化性試験では、 0.5 % (w/v) の糖を唯一の炭素源として MRS-CS 培地に添加した. 培養は嫌気 チャンバー内で 37 ℃で行った.

通常の遺伝子組換え操作には大腸菌 DH5a 株を用いた. 必要に応じてクロラムフェニコール (Cm; ビフィズス菌は2.5 μ g/mL, 大腸菌は10 μ g/mL), スペクチノマイシン (Sp; *B. longum* は 30 μ g/mL, *B. infantis* は 10 μ g/mL, 大腸菌は75 μ g/mL), カナマイシン (50 μ g/mL) を添加した. 特に記載がない限り, 菌の増殖は OD₆₀₀で測定した.

HMOトランスポーター解析用のビフィズス菌宿主の構築

HMOトランスポーターの生理的な基質特異性は、細胞内HMO分解酵素遺伝子(プラスミドpMSK65)を保持する *B. longum* 105-A $\Delta lnbX \Delta gltA$ 株(後述)において、 トランスポーターを異種発現することによって解析した (Fig. 1A および 1B). 菌株およびプラスミド作製の詳細 は、Sakanaka *et al.* (2019)の Materials and Methods に 記した通りである.

B. infantis JCM 1222^T由来のトランスポーター遺伝子 Blon_0341-0343 と Blon_2202-2204 な ら び に B. kashiwanohense JCM 15439^T由来のトランスポーター遺伝子 BBKW_1838-1840 は PCR 増幅した後, xfp プロモーター 下流に位置するように pJW241 (Yamamoto et al., 2010) の NdeI 部位に挿入した. 構築したプラスミドを, pMSK65を保持する B. longum 105-A ΔlnbX ΔgltA に導入 した. PCR に使用したプライマーは, Sakanaka et al. (2019)の Materials and Methods に記した通りである.

組換えタンパク質の発現と精製

B. infantis JCM 1222^T由来のSBP (Blon 343 および Blon_2202)は、ヒスチジン(His)タグを付加もしく は付加せず発現させた. 付加していない場合は, Blon 0343 (アミノ酸残基 32-469) および Blon 2202 (ア ミノ酸残基 26-460) に対応する遺伝子を Sakanaka et al. (2019) の Supplementary Table S3 に記載のプライ マーを用いて PCR 増幅し, pCDF23 (Nakagawa et al., 2016)のNdeIおよびXhoIの部位に挿入した.構築し たプラスミドを, pRARE2 を保持する大腸菌 BL21 (DE3) △lacZ株 (Sakurama et al., 2013) に導入し, 終濃度 0.1 mM イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)の 存在下で18℃で一晩培養した. 菌体を超音波処理によっ て破砕し、終濃度80%となるよう硫酸アンモニウムを 添加した. 上清画分をMono Q 5/50 GL (GE Healthcare) および Superdex 200 increase 10/300 GL(GE Healthcare) でさらに精製し、等温滴定型熱量測定 (ITC) に供した.

His タグを付加した Blon_0343 (アミノ酸残基 29-469) および Blon_2202 (アミノ酸残基 24-460) の タンパク質をコードする遺伝子は Sakanaka *et al.* (2019) の Supplementary Table S3 に記載のプライマーを用いて PCR 増幅し, pETM11 の NcoI および EcoRI 部位に挿入 した. 構築したプラスミドは大腸菌 BL21 (DE3) に導 入し, 同様に誘導発現させた. 細胞破砕液を HisTrap HP カラム (GE Healthcare) に供した後, HiLoad Superdex G75 26/60 (GE Healthcare) によってさらに精製した. His タグは TEV プロテアーゼを用いて除去し,得られた タンパク質を結晶化に用いた. タンパク質濃度は 280 nm での吸光度を測定することにより決定した (Blon_0343 は 77,810 M⁻¹ cm⁻¹).

ITC 分析

Blon_0343 および Blon_2202 の糖リガンドに対する結 合は,ITC (MicroCal iTC200; GE Healthcare) によっ て熱力学的に解析した.タンパク質を 10mM リン酸ナ トリウム緩衝液 (pH6.5) で透析し,リガンドを同じ透 析 緩 衝 液 に 溶 解 し た. 204 μ Lの 反 応 セ ル 中 で, 45–250 μ M のタンパク質を 25°C,750 rpm で攪拌した. リガンド (2–10mM)の滴定は 180 秒の間隔で 20 回行っ た.データを希釈熱で補正した後,One-Set-of-Sites 結合 モデルによりフィッティングを行った.

Blon_2202の結晶化と構造決定

野生型もしくはセレノメチオニン(SeMet)置換型 Blon_2202の結晶化は10mM 2'-FLまたは3-FLの存在 下、蒸気拡散法で行った、リザーバーには、100mM MES (pH6.5), 25% PEG-500MME, および10mM ZnSO₄を用いた. SeMet 置換体については 2.1Å, 2'-FL 複合体については1.3Å. 3-FL 複合体については1.4Åの 分解能で回折データを収集した. セレンによる異常散乱 (SAD)を用いて位相決定を行い、得られた構造を 2'-FLおよび3-FL複合体構造を決定する際の分子置換モ デルとして使用した. Phenix.AutoSol (McCov et al., 2007; Adams et al., 2010), Phenix.AutoBuild (Terwilliger, 2004), Coot (Emsley & Cowtan, 2004) および phenix. refine (Afonine et al., 2012) を使用して精密化した後, MolProbity (Adams et al., 2010) を使って妥当性を確認 した. データ回収・解析の詳細については Sakanaka et al. (2019)の Supplementary Table S1 に記した通りであ る. 図の表記には PyMOL Molecular Graphics System v1.7.2.2 (Schrodinger) を使用した.

Blon_0343 および Blon_2202 ホモログの保存性および系 統学的解析

Blon_0343 および Blon_2202 ホモログの保存性は、 NCBI ゲノムデータベースに対する BlastP 解析によって 調べた. その際, *B. longum* SC596 のゲノム配列 (Garrido *et al.*, 2016) も解析に含めた. 系統学的解析には、アミ ノ酸配列が 60%以上一致する配列を用いた (Blon_0343 と Blon_2202 が 60% 一致であるため). 18 種類の異なる 配列 を MAFFT (https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/) にてアラインメントし、近隣結合法により系統 樹 を 作成 した. また、アミノ酸 残基の保存性は、 WebLogo (https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) を 使用して解析した.

ヒト試料の収集

36名の母乳栄養児糞便(男児18名,女児18名,1.4-5.7 月齢,平均2.9±1.2月齢)は長尾助産医院(京都府)に て回収した.また,母乳は,乳児糞便を収集した日に 32名の母親から提供して頂いた.成人サンプルは,31 名(男性16名,女性15名,21-75歳,平均42.3±16.8歳) を石川県立大学(石川県)にて回収した.これらのサン プルは盲検下で解析に使用した.

HMO 分析

母乳,乳児糞便および培養上清中の糖は,既報に従っ て高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で解析した (Gotoh *et al.*, 2018).内部標準物質はマルトヘプタオー ス(母乳および培養上清)またはメリビオース(乳児糞 便)を用いた.

糞便 DNA 中の 16S rRNA 遺伝子および FL トランスポー ター遺伝子の定量

糞便 DNA は既報に従って抽出した(Yamada et al., 2017). Blon_0343 遺伝子, Blon_2202 遺伝子, 全バクテ リアおよび Bifidobacterium 属細菌の 16S rRNA 遺伝子の コピー数決定には, 定量 PCR(TB グリーンプレミック ス Ex Taq II; TaKaRa Bio)を用いた.存在率(%)は, FLトランスポーター遺伝子または Bifidobacterium 属細 菌の 16S rRNA 遺伝子のコピー数を全バクテリアの 16S rRNA 遺伝子コピー数で割ることで算出した.定量 PCR で使用したプライマーは Sakanaka et al. (2019)の Supplementary Table S3 に記した通りである.検量線は, B. infantis JCM 1222^Tまたは B. kashiwanohense JCM 15439^T のゲノム DNA を鋳型として作成した.

メタゲノムデータセット解析

糞便DNAメタゲノムデータ(アクセッション番号 qiime:621) lt, MG-RAST v4.0.3 (http://metagenomics. anl.gov/)から取得した(Yatsunenko et al., 2012). Perl および Python スクリプトおよび公的に入手可能なソフ トウェアを用いてクオリティチェック後 (Li & Durbin, 2009; Niu et al., 2010), 132,556 ± 76,952 リード / サンプ ル(平均 ± SD; 計83名)のシークエンスデータを得て、 Blon_0343 および Blon_2202 ホモログにマッピングした. 各遺伝子の相対量(%)は、当該遺伝子にマッピングさ れたリード数を全リード数で割ることで算出した. Bifidobacterium 属細菌の存在率(%)は、上述のアクセッ ション番号から取得した. 解析したデータセットは、米 国 (*n*=50), マラウイ (*n*=18) およびベネズエラ (*n*=15) に居住する83名から構成されており、母乳栄養児(1 歳以下)が34名、人工乳栄養児(1歳以下)が27名で あり, 成人は(18歳以上)は22名であった.

倫理的配慮

本研究は、京都大学(R0046)、滋賀県立大学(71-3)、 石川県立大学(2016-2)の倫理委員会の審査・承認を 受け、ヘルシンキ宣言に基づいて実施した.乳児糞便は 母親の同意を得て、それ以外は全ての被験者からイン フォームド・コンセントを得た上で解析に使用した.

結 果

HMO トランスポーター評価系の構築および Blon_0341-

0343 と Blon_2202-2204 の評価

HMO 取込み系を欠損させると同時に細胞内 HMO 分 解酵素を発現させた株B. longum 105-A ΔlnbX ΔgltA/ pMSK65(HMO分解酵素遺伝子⁺)を作出した(Fig.1A および1B;以後,本宿主株をMS554株と表記する). MS554株は、HMOsを炭素源として利用することがで きなかったが、この菌株に B. infantis JCM 1222^T由来の 2つの ABC トランスポーターパラログ Blon_0341-0343 および Blon 2202-2204 (SBP のアミノ酸配列の一致度 は 60%) (Garrido et al., 2011) を異種発現させたところ, 精製 HMO 混合物存在下において非発現株よりも生育能 が上昇した(データ未掲載). Lac存在下では発現株と 非発現株との間に差は見られなかった. HMO 混合物存 在下で培養した際の上清を HPLC 分析に供したところ. いずれのトランスポーター発現株も 2'-FLと 3-FLを速 やかに消費することが明らかとなった (Fig.1C). さら に、Blon_2202-2204発現株は、培養の後期においてラ クトジフコテトラオース(LDFT)およびラクト-N-フ コペンタオース (LNFP) Iも利用することが示された. 他のHMO分子種 [LNT, ラクト-N-ネオテトラオース (LNnT). LNFP II/ III およびラクト-N-ジフルコヘキサ オース(LNDFH) I/II]の濃度は株間で差がなかった (Fig.1C およびデータ未掲載). 以上より, Blon 0341-0343とBlon_2202-2204は、基質特異性が僅かに異なる FLトランスポーターであることが明らかとなった.以 後,Blon_0341–0343 を FL トランスポーター1(SBP は FL1-BP), Blon_2202–2204 を FL トランスポーター2(SBP はFL2-BP) と表記する.

B. infantis JCM 1222^Tの生育における FL トランスポー ター1 および2 の重要性

次に、2つのトランスポーターの片方または両方を欠 損させた B. infantis JCM 1222^T株を作製した.FLトラ ンスポーター1(ΔBlon_0341-0343)またはFLトラン スポーター2(ΔBlon_2202-2204)の単独マーカーレス 欠損株は得られたが、二重マーカーレス欠損株は得られ なかった.そこで代わりに、FLトランスポーター1欠 損株(ΔBlon_0341-0343)のFL2-BP遺伝子に挿入変異 (Blon_2202::pMSK101)を導入することで二重欠損株を 取得した.結果として、4種の遺伝子欠損株、すなわち ΔBlon_0341-0343(ΔFL1株),ΔBlon_2202-2204(ΔFL2 株),Blon_2202::pMSK101(FL2-BP^{INS}株)およびΔBlon_ 0341-0343 Blon_2202::pMSK101(ΔFL1 FL2-BP^{INS},二 重欠損株)を以降の実験に用いた.

これらの菌株はガラクトース(Gal)の存在下では生 育に差が見られなかった. 2'-FLまたは3-FL存在下では FLトランスポーター2単独欠損株(ΔFL2株および



Fig. 1. A platform for evaluating *in vivo* substrate specificity of HMO transporters. Specificity of the two candidate HMO transporters from *B. infantis* was analysed by their heterologous expression in the pMSK65-harboring *B. longum* 105-A Δ*lnbX* Δ*gltA*, the strain expressing intracellular HMO-degrading enzymes but deficient in growth on purified HMO mixture. (A) The *E. coli-Bifidobacterium* shuttle vector pMSK65 carrying the genes encoding intracellular HMO-degrading *exo*-glycosidases from *B. infantis*. (B) *B. longum* 105-A Δ*lnbX* Δ*gltA* strain with pMSK65 as a host for evaluating *in vivo* specificity of HMO transporters. The candidate gene cluster is introduced into the host using a compatible plasmid. (C) Changes in the concentration of each HMO in culture supernatant during growth on 0.5 % (w/v) purified HMO mixture. The strains carrying the following plasmids were used for the analysis: an empty vector (open diamonds); the plasmid expressing FL transporter-1 (locus tags Blon_0341 – 0343, gray diamonds); and the plasmid expressing FL transporter-2 (locus tags Blon_2202-2204, black diamonds). Experiments were technical triplicates, and data are the means ± SD. Reproduced with modifications from Sakanaka *et al.* (Sci. Adv. (2019) 5:eaaw7696) [© 2019 American Association for the Advancement of Science (Licensed under CC BY-NC; https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)].

FL2-BP^{INS}株)の増殖は野生型株とほぼ同様であったの に対し、FLトランスポーター1単独欠損株(Δ FL1)で は生育に遅延が見られ、二重欠損株(Δ FL1 FL2-BP^{INS}) では大幅な生育能の低下が観察された(データ未掲載). LDFT存在下では野生型株とFLトランスポーター1単 独欠損株(Δ FL1)の間で生育に大きな差は見られなかっ たが、FLトランスポーター2単独欠損株(Δ FL2 または FL2-BP^{INS})と二重欠損株(Δ FL1 FL2-BP^{INS})はほとん ど生育できなくなっていた、LNFP I存在下では、 Δ FL2 株以外はどの株も生育に差が見られなかった. FL2-BP^{INS}株およびΔFL1 FL2-BP^{INS}株の生育がLNFP I 存在下で見られたのは予想外であったが、この株では FLトランスポーター2の膜貫通ドメイン遺伝子がゲノ ム上に残っているため、別のSBPがFL2-BPの代わりに LNFP I 取込みに関与した可能性が考えられた.いずれ にせよFLトランスポーター2がB. infantisのLNFP Iの 利用に重要な役割を果たしていることは間違いなさそう である.以上より, B. infantis においてFLトランスポー
ター1は2'-FLと3-FLの取込みに,FLトランスポーター 2はそれらに加えてLDFTとLNFPIの取込みに寄与す るトランスポーターであることが明らかとなった(デー タ未掲載).

精製 HMO 混合物 は FL トランスポーターの 基質 (2'-FL, 3-FL, LDFT および LNFP I) を約50%程度の 濃度で含んでいるが, *B. infantis* 野生型株と4種の欠損 株を HMO 混合物を炭素源として培養した場合には生育 の差は見られなかった(データ未掲載). しかしながら, 野生型株と二重欠損株(Δ FL1 FL2-BP^{INS}) 間で競合培 養を行ったところ, 2'-FL または精製 HMO 混合物存在 下において野生型株は二重欠損株よりもそれぞれ 1000 倍および 100 倍程度優勢に生育した(それぞれ $p=8.14 \times$ 10^{-10} および 3.30×10^{-6} , スチューデントの t 検定)(デー タ未掲載). ガラクトオリゴ糖(GOS)存在下で競合培 養を行った場合には、両株の間には差が見られなかった (p=0.18). 以上の結果から、FL トランスポーター1お よび 2 は, *B. infantis* が HMOs 豊富な環境で優勢になる ための重要な因子であることが示された.

FL1-BP および FL2-BP の糖リガンドへの結合

FL1-BP および FL2-BP の糖リガンドへの結合を ITC を使用して解析したところ、エンタルピー駆動型である ことが分かった(Table 1). FL1-BP の 2'-FL に対する $K_{\rm d}$ 値($\approx 10\mu$ M)は、2'-FL および 3-FL に対する FL2-BP の $K_{\rm d}$ 値($5-6\mu$ M)とほぼ同じであった一方で、LDFT に対する FL2-BP の親和性は低かった($\approx 200\mu$ M).すな わち、FL1-BP は 2'-FL に特異性が高い一方で FL2-BP は 2'-FL、3-FL そして弱いながらも LDFT にも親和性を有 しており、基質特異性が異なる SBP であることが明ら かとなった.他の糖を滴加した際には熱量変化は見られ なかった(データ未掲載).

FL2-BPの構造解析

X線結晶構造解析の結果, FL2-BPはSCOPデータベー ス (Andreeva et al., 2004) 上のクラスターBに分類さ れる典型的な SBP 構造を有していることが分かった. すなわち、サイズが異なる二つのドメインがリガンド結 合サイトを構成するヒンジ領域で繋がっていた(データ 未掲載). 2'-FL および 3-FL との FL2-BP 複合体の結合 サイトを比較したところ、Fuc-[Gal/Glc] (Fuc: フコース; Glc: グルコース) で形成される2糖構造モチーフを厳密 に認識していることが明らかとなり、FL2-BPが2'-FL および3-FLに対して同等の親和性(Table 1)を有する 構造基盤であることが明らかとなった(Fig.2A). すな わち、Fuc 部分とFuc に連結した糖部分(2'-FLでは Gal, 3-FLではGlc)は、どちらの複合体でも同じ箇所 に位置していた(Fig.2A および 2B). 2'-FLの還元末端 Glcと3-FLの非還元末端Galを認識する部位は結合サイ トの溶媒側に位置しており、これらの糖は約50度傾い て結合していた.

Fuc の 3 つ の OH 基 は, G321, S212, E284, S112, N114 および K115(本残基は 2'-FL 複合体のみ)との間で, また環内酸素(O5)は Y59の OH 基と水素結合していた. Y59, F 92 および K115 は疎水環境を形成して Fuc のメ チル基を包み込んでいた. 2'-FL における Gal および 3-FL における Glc は,水素結合および W286 によるス タッキングで認識されており(Fig.2A), FL2-BP が両 基質を同程度に認識可能であるのは Q63 側鎖の柔軟性 によるものであることが示唆された.Fuc-[Gal/Glc] 構

Table 1. Isothermal titration calorimetry analysis of the binding of FL1-BP and FL2-BP to mono- and difucosyllactose.^a

Protein	Ligand	<i>K</i> a (×10 ⁵ M ⁻¹)	$K_{ m d}$ $(\mu { m M})^b$	ΔG^0 (kcal mol ⁻¹) ^c	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S^0$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta S^0 $ (cal K ⁻¹ mol ⁻¹) ^c	<i>n</i> (binding site)
FL1-BP	2'-FL	1.05 ± 0.23	9.75	-6.8	-23.6 ± 0.5	16.8	-56.3	0.85 ± 0.14
FL2-BP	2'-FL	1.86 ± 0.12	5.40	-7.2	-14.2 ± 0.7	7.0	-23.6	0.90 ± 0.04
	3-FL	1.69 ± 0.11	5.95	-7.1	-14.0 ± 0.4	6.9	-23.2	1.12 ± 0.14
	LDFT	0.05 ± 0.00	191.11	-5.1	-6.8 ± 0.5	1.7	-5.7	1.02 ± 0.02

^a Reproduced with modifications from Sakanaka et al. [Sci. Adv. (2019) 5:eaaw7696] [© 2019 American Association

for the Advancement of Science (Licensed under CC BY-NC; https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)].

^{*b*} Dissociation constants (K_d) were calculated from the reciprocal of K_a .

^c The Gibbs free energy change (ΔG^0) and the entropy change (ΔS^0) were calculated from the equations $\Delta G^0 =$

 $-RT \ln K_a$ and $T\Delta S^0 = \Delta H - \Delta G^0$, respectively (*R*: the gas constant; *T*: the absolute temperature).



Fig. 2. Structural basis of the dual recognition of 2'-FL and 3-FL by FL2-BP from *B. infantis* JCM 1222^T (A and B) and conservation of FL-recognizing residues in the ligand binding site of FL-BPs (C and D) (A) Conformations of 2'-FL and 3-FL in the ligand binding site of FL2-BP. Sugars are depicted by stick models. The sugar rings of Fuc and Gal of 2'-FL and those of Fuc and Glc of 3-FL well overlap, while the Glc of 2'-FL and the Gal of 3-FL shifts about 50°. (B) Structural mimicry between 2' -FL and 3-FL (α-anomer). Axial O4 of Gal moiety of 2'-FL corresponds to α-anomeric oxygen (O1) of 3-FL, when Lac moiety is inverted each other. (C) Conservation of residues interacting with 2'-FL and/or 3-FL visualized by sequence Logos. (D) Phylogenetic tree constructed using the FL-BP homologs that share ≥60 % identity. The signatures associated with the four identified clusters show significant changes in distinct binding residues between the homologs of FL1-BP (cluster IV) (gray pentagon) and FL2-BP (cluster I – III) (black pentagon). Reproduced with modifications from Sakanaka *et al.* (Sci. Adv. (2019) 5:eaaw7696) [© 2019 American Association for the Advancement of Science (Licensed under CC BY-NC; https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)].

造の厳密な認識とは対照的に 2'-FL における Glc および 3-FL における Gal とタンパク質間の相互作用は多くなく、 この結合部位は溶媒に向かって開いていた. このことが LDFT および LNFP I の結合に重要であると推察された.

次に FL1-BP および FL2-BP ホモログの結合サイトの アミノ酸残基を比較した(Fig.2C および 2D). その結果, Lac 部分を認識する部位と Fuc 部分を認識する部位で保 存性が大きく異なっていた. Lac 部分を認識する6種の アミノ酸残基(S60,Q63,A88,D161,W286,S322) は全てのホモログにおいて保存されていたが,Fuc 部分 を認識するアミノ酸残基は,S112 および G321 を除く5 種の残基(Y59,N114,K115,S212 および E284)に おいて多様性を示した.すなわち系統樹解析によると FL-BP ホモログは4つのクラスター(I-IV)に分類され たが,これらのクラスター間で Fuc 認識残基に大きな多 様性が見られた(Fig.2D). *B. infantis* JCM 1222^T由来 の FL1-BP および FL2-BP はそれぞれクラスター IV および クラスター II に分類されるが,その基質特異性の違いはこ れらのアミノ酸残基の違いに起因していると推察された.

FL-BPホモログのビフィズス菌ゲノムにおける保存性

BlastP 解析を行った結果 (アミノ酸配列の一致度 60%以上で評価), FL1-BPホモログ (クラスターIV) および FL2-BPホモログ (クラスターI から III) は B. infantis, B. longum, B. longum subsp. suis (B. suis), B. breve, Bifidobacterium pseudocatenulatum お よ び B. kashiwanohense にのみ見出され (Fig.3), 他の細菌種に は全く検出されなかった. B. infantisでは 19株のうち 16株がいずれかの FLトランスポーターを有し, 11株は 両ホモログを有していた. B. longum は 39株のうち 3株 しか FL2-BPホモログを有しておらず, それらのうちの 2つは B. infantis のそれと 71%程度の一致 (クラスター

Species / subspecies	Occupancy in (sub)species	Strain	FL1-BP homolog	FL2-BP homolog
		JCM 1222 [⊤]	IV	II.
		BIC1206122787	IV	
		BIC1307292462	IV	II
		BIC1401111250	IV	II
		BIC1401212621a	IV	<u> </u>
	16 / 19 strains	BIC1401212621b	IV IV	
		BIB1401242951	IV IV	
B. longum subsp. infantis		BIB1401272845a	IV IV	
g		BIB1401272845b	IV IV	
		IN-07	IV IV	
		INCTO 13219	10	
		IN-F29		
		TPY12-1		
		BT1		
		1888B		ï
	1	SC596		ii ii
B. longum subsp. longum	3/39 strains	JDM301		
Di tenguni eusepi tenguni		CMCC P0001		III
	10 / 89 strains	MCC 1128	IV	
		MCC 1340		
		BR-06		
		BR-10		
B breve		BR-14		
D. Meve		BR-15	IV	
		BR-20		
		BR-21		
		BR-A29		
		BR-129	IV IV	
		JCM 12001		
	6 / 14 strains	CA-C29		
B. pseudocatenulatum		CA-K29a		
		1896B		
		TM10-1		
		PV20-2		
B. kashiwanohense	2 / 2 strains	JCM 15439T		
B longum subsp. suis	1/2 strains	BSM11-5		
D. Ionguin subsp. suis	112 30 400	BOWTI-0		

90 % ≤ Identity ≤ 100 % 61 % < Identity < 90 % Identity ≤ 61 %

Fig. 3. Distribution of FL-BP homologs within *Bifidobacterium*. Distribution of FL1-BP and FL2-BP homologs (>61 % identity) among *Bifidobacterium* species/subspecies. FL1-BP and FL2-BP from *B. infantis* JCM 1222^T were used as queries for BlastP analysis. The cluster numbers (I to IV) are indicated based on the phylogenetic analysis shown in Fig.2D. The sequences of *B. longum* without subspecies identification in the NCBI database were excluded from the analysis. No close homologs (≥60 % identity) were found in the genomes of other bacterial taxa in the NCBI database. Reproduced with modifications from Sakanaka *et al.* (Sci. Adv. (2019) 5:eaaw7696) [© 2019 American Association for the Advancement of Science (Licensed under CC BY-NC; https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)].

III) であった. *B. breve* のゲノムでは、FL-BP のどちら か一方のホモログが89株のうち10株に見いだされた. *B. pseudocatenulatum* は14株のうち6株にFL2-BP が存在 していた. *B. kashiwanohense* および*B. suis* では、それ ぞれ2株および1株がFL2-BPホモログを有していた. *B. kashiwanohense* JCM 15439^T 由来のFL2-BP ホモログ (ク ラスターIII) は*B. infantis* のそれと71%程度の同一性 を示したが、当該遺伝子クラスター BBKW_1838–1840 を MS554 株で異種発現した結果、*B. infantis* のFL トラ ンスポーター2と同じ基質特異性を有することが明らか となった(データ未掲載).

ビフィズスフローラ形成における FL トランスポーター 遺伝子の役割

日本人(36名の母乳栄養児と32名の成人)の糞便 DNAを定量 PCR 解析に供した. その結果, *Bifidobacterium* 属細菌および FL2-BP ホモログの存在率 が成人に比べて母乳栄養児の糞便で有意に多いことが明 らかとなった(Fig.4A, *p*<0.001, マンホイットニーの *U* 検定).

興味深いことに、母乳栄養児群では、Bifidobacterium 属細菌とFL2-BPホモログ遺伝子またはFL1/2-BPホモ ログ遺伝子の占有率との間に有意な正の相関が観察され た(FL2-BP遺伝子はp=0.512, p=0.001, FL1/2-BP遺 伝子はp=0.501, p=0.002; スピアマンの順位相関係数; Fig.4B). FL1-BPホモログ遺伝子と Bifidobacterium 属 細菌では弱い正の相関が観察された(p=0.370, *b*=0.026). 一方で、成人群では、相関がわずかにしか検 出されなかった(FL1/2-BP遺伝子においてのみ o=0.386. p=0.032). 次に、母乳および乳児糞便中(32) 母子ペア)のHMO 濃度を比較したところ、糞便中にお ける FL-BP 遺伝子の存在が、腸管内におけるフコシル 化HMOsの消費挙動と一致していた. すなわち FL-BP 遺伝子が検出された糞便群(n=25)では、FLトランス ポーターの基質 (2'-FL, 3-FL, LDFT, および LNFP I) の濃度がFL-BP遺伝子の非検出群(n=7)よりも有意 に低い一方で(Fig.4C, p=0.0098, マンホイットニー のU検定),母乳中のFLトランスポーター基質の濃度 は両群間で差はなかった (p=0.2944). また, FL2-BP 遺伝子の占有率は乳児糞便中3-FL濃度(ρ=-0.416, p=0.018) およびLNFPI濃度 ($\rho=-0.551, p=0.001$) と有意な負の相関関係にあった(Fig.4D; スピアマンの 順位相関係数).

上記の解析とは別に、データベースに登録されたメタ ゲノムデータセット (MG-RAST, アクセッション番号 qiime:621) (Yatsunenko *et al.*, 2012) を利用して、 *Bifidobacterium* 属細菌の存在量とFL-BP 遺伝子量の関 連性を評価した.本データセットには米国 (n=50),マ ラウイ (*n*=18) およびベネズエラ (*n*=15) に居住す る83名の糞便メタゲノムデータが含まれており、母乳 栄養児(n=34,1歳以下),人工乳栄養児(n=27,1歳 以下)および成人 (n=22, 18歳以上)から構成されて いる. 解析の結果, Bifidobacterium 属細菌および両方の FL-BP 遺伝子.特にFL2-BP 遺伝子が.人工乳栄養児群 や成人群と比較して母乳栄養児群において有意に濃縮さ れていることが明らかとなった(Fig.4E). 興味深いこ とに、マラウイとベネズエラの群では、両方のFL-BP 遺伝子が米国の群よりも豊富に存在しており(Fig.4F). かつ両方のFL-BP 遺伝子(特にFL2-BP 遺伝子)と Bifidobacterium 属細菌の存在率の間には、強い正の相関 が観察された(Fig.4G:スピアマンの順位相関係数). 以上の結果から、FLトランスポーター(特にFLトラン スポーター2)は、フコシル化HMOsを取込むことで、 母乳栄養児の腸内におけるビフィズスフローラ形成に関 与していることが強く示唆された.

考 察

日本人の腸内には海苔由来のポルフィランの分解および輸送に関わる遺伝子が特異的に検出されるように,腸 内細菌は宿主の食事に適応しながら進化を遂げている (Hehemann et al., 2010).また,腸内細菌のトランスポー ターは,他の細菌との競争に打ち勝ち,腸内で安定に定 着するための重要な因子であることが最近報告されてい る (Maldonado-Gómez et al., 2016; Leth et al., 2018).本 研究では, B. infantisの二種類のFLトランスポーター を解析し,これらの基質特異性の僅かな違いがビフィズ ス菌にどのような進化的な利点を与えているのか,およ び,母乳栄養児における腸内細菌叢の形成にどのように 寄与しているのかについて理解を得ることを試みた.

これまで, *B. infantis* JCM 1222^TのFL トランスポー ター1および2 は基質特異性が同じであると推測されて いたが (Garrido *et al.*, 2011), 今回の結果からその基質 特異性は重複しているものの僅かに異なっていることが 示 さ れ た (Fig.1C お よ び Table 1). FL1-BP お よ び FL2-BP は系統的に離れており, FL 結合に関わるアミノ 酸残基も異なっていた (Fig.2C および 2D). 特に Fuc 認識に関わるアミノ酸残基 N114, K115 および E284 は, FL2-BP ホモログ (クラスター I-III) では保存されてい たが, FL1-BP ホモログ (クラスター IV) においてはそ れぞれセリン, グルタミン酸, グリシンに置換されてお り, これが FL1-BP および FL2-BP 間の基質親和性の違 いを生み出している可能性が示唆された. さらに, 糞便 DNA 解析より, 二種の FL トランスポーターのうち特に



Breast-fed group

Fig. 4. The abundance of *Bifidobacterium* in breast-fed infant guts is associated with FL transporter genes. The results presented are obtained by analysing Japanese subjects recruited in this study (A–D) and by data mining of a deposited metagenome dataset (MG-RAST, accession number qiime:621) (Yatsunenko *et al.*, 2012) (E–G). (A) Relative abundance (%) of genus *Bifidobacterium* and two FL-BP homologs in stool DNA of breast-fed infants (*n*=36) and adults (*n*=31). The copy number of the genes attributable to *Bifidobacterium* 16S rRNA, FL1-BP, and FL2-BP, which was determined by qPCR analysis, was divided by the copies of 16S rRNA gene attributable to total bacteria. Mann-Whitney *U*-test was used for evaluating the statistical significance. The data are shown by box plot, in which the middle bar indicates the median while the top and bottom of the box indicate

the third and first quartiles, respectively. Whiskers represent the lowest and highest values within 1.5-times the interquartile range from the first and third quartiles, respectively, (B) Spearman's rank correlation coefficient analysis between the relative abundances of genus Bifidobacterium and either (left and middle panels) or both (right panel) of FL-BP genes in the breast-fed infant (black diamonds) and adult (open diamonds) groups. The data obtained in (A) were used for the analysis. (C) The concentrations of 2'-FL, 3-FL, LDFT, and LNFP I (substrates for FL transporter-1 and -2) in breast milk and infant stools (32 mother-infant pairs) were compared between FL-BP gene-detected (positive, n = 25) and undetected (negative, n = 7) groups. Mann-Whitney U-test was used for evaluating the statistical significance. (D) Spearman's rank correlation coefficient analysis between the relative abundance of the FL1-BP or FL2-BP gene and the faecal concentration of each substrate HMO. The data obtained in (C) were used for the analysis, and the results are shown as a heatmap. * and ** indicate p < 0.05 and p < 0.01, respectively. (E and F) The deposited metagenome data of 83 individuals from USA (n = 50). Malawi (n = 18), and Venezuela (n = 15) were used for the analysis (132,556 ± 76,952 reads/sample) (Yatsunenko et al., 2012). The abundances (%) of genus Bifidobacterium and two FL-BP homologs in the faecal samples obtained from breast-fed (n=34) and formula-fed (n=27) infants (≤ 1 year old) and adults ($n=22, \geq 18$) years old) are shown in (E), and those in the faecal samples of breast-fed infants living in USA (n=10), Malawi (n=14), and Venezuela (n=10) are shown in (F). See Materials and Methods for read count and abundance calculation for FL-BP genes. Different letters (a, b, and c) indicate statistically significant differences among the three groups (p < 0.05, Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction). (G) Spearman's rank correlation coefficient analysis between the relative abundances of genus Bifidobacterium and either or both of two FL-BP genes in the breast-fed infant group. The data obtained in (F) were used for the analysis, and the results are shown as a heatmap. *, **, and *** indicate p < 0.05, p < 0.01, and p < 0.001, respectively. Reproduced with modifications from Sakanaka et al. (Sci. Adv. (2019) 5:eaaw7696) [© 2019 American Association for the Advancement of Science (Licensed under CC BY-NC; https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)].

FLトランスポーター2が、母乳栄養児腸内でのビフィ ズスフローラ形成に重要であることが示唆された (Fig.4A-D).FLトランスポーターの重要性は、既報の メタゲノムデータの解析からも裏付けられた(Fig.4E-G).興味深いことに、マラウイとベネズエラに在住し ている母乳栄養児の腸内における*Bifidobacterium* 属細 菌とFLBP遺伝子の存在量には強い正の相関が検出さ れたが、このような相関は米国在住の母乳栄養児では観 察されなかった.

ビフィズス菌は、哺乳動物、特にヒトの腸管内での増 殖に関わる遺伝子を獲得することによって宿主との共進 化を遂げてきたと考えられており (Milani et al., 2014), 特にビフィズス菌は多数の糖質 ABC トランスポーター を獲得してきたと推察されている (Milani et al., 2016). 最近の報告において、FLトランスポーター2のホモロ グがFLの資化に関与していることが既に示されていた が (Garrido et al., 2016; Matsuki et al., 2016), 本研究で はビフィズス菌が如何にして二種のFLトランスポー ターを適応進化させてきたのかを詳細に解明すると共 に、その生理的意義を明らかにすることができた. FL トランスポーター2の広い基質特異性は、SBPのアミノ 酸残基の置換による機能獲得に起因しており、それに よって FL2-BP は 2'-FL および 3-FL の両方を同様の親和 性で認識し、さらに LDFT および LNFP I も微弱ながら も認識するように適応進化してきたと推測される.この 適応進化の重要性は、母乳栄養児糞便中のFL2-BP遺伝 子の存在量と3-FL濃度の間で有意な負の相関が観察さ れ、一方でFL1-BP遺伝子ではそのような相関が見られ なかったことからも裏付けられる (Fig.4D). また, FL2-BP 遺伝子の存在率と LNFP I 濃度との間にも有意 な負の相関が検出されている. 従って, このFLトラン スポーター遺伝子の適応進化が HMOs を介したビフィ ズス菌とヒトの共進化戦略において重要な役割を担って いると考えられる. また, 2'-FLだけでなく 3-FLも強く 認識できるということは, FLトランスポーター2を有 するビフィズス菌が非分泌型個体 (*FUT2^{-/-}*)によって 産生される HMOs (2'-FLの代わりに 3-FLが大量に存 在する (Urashima *et al.*, 2012))に関しても効率よく利 用できることを示唆している. したがって, FLトラン スポーター2は HMO 主要成分の資化に極めて重要な因 子であると考えられる.

本研究の成果とこれまで蓄積されてきた知見(Sela et al., 2008; Katayama, 2016; Thomson et al., 2018; Zúñiga et al., 2018) を合わせることで,ビフィズス菌のフコシル 化 HMOs の利用戦略について統合的に理解することが 可能となった.「どの HMO トランスポーターがビフィ ズスフローラの形成に最も重要であるのか」といった課 題はまだ残っているものの,今回得た成果から HMOs を介したビフィズス菌と乳児の共進化機構の一端を垣間 見ることに成功したといえる.

要 約

乳児期の腸内細菌叢がヒトの健康に長期的な影響を及 ぼすことが明らかとなってきた.母乳栄養児の腸内では, ビフィズスフローラが形成されることが古くから知られ ており、これは乳児腸内に生息するビフィズス菌が母乳 に含まれる HMOs を資化可能であるためと考えられて きたが、現在までビフィズスフローラ形成の分子機構は 十分に明らかとされていない.本研究では. B. infantis 由来の二種類のフコシルラクトーストランスポーター (FLトランスポーター1および2)を包括的に解析した. また、ヒト糞便試料における DNA 分析および HMO 消 費様式の解析から、母乳栄養児腸内でのビフィズスフ ローラ形成には、二種類のFLトランスポーター(特に FLトランスポーター2)が関与していることを明らか とした. さらに、FLトランスポーター2のSBPの構造 解析および当該 SBP のホモログの系統解析から、ビフィ ズス菌のHMO 分子種における適応進化戦略, すなわち 如何にしてトランスポーターが幅広い種類のHMOs を 取込めるように進化を遂げてきたのかについて理解を深 めることができた.以上の成果より、ビフィズスフロー ラの形成機構、および、HMOsを介したビフィズス菌 と乳児の共生・共進化の分子的基盤の一端が明らかと なった.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- Sakanaka, M., Yachi, H., Kurihara, S., Fukiya, S., Yokota, A., & Katayama, T. 2016. Physiological characterization of 2' -fucosyllactose transport systems from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. The 4th International Propionibacteria and Bifidobacteria symposium. 20–23 September. Ireland.
- 2)谷内寛之,阪中幹祥,後藤愛那,栗原新,吹谷智,横田 篤,片山高嶺. 2016. ビフィズス菌Bifidobacterium longum subsp. infantisのフコシルラクトーストランスポー ターに関する研究.第9回北陸合同バイオシンポジウム. 11月4-5日.福井.

原著論文

 Sakanaka, M., Hansen, M. E., Gotoh, A., Katoh, T., Yoshida, K., Odamaki, T., Yachi, H., Sugiyama, Y., Kurihara, S., Hirose, J., Urashima, T., Xiao, J. z., Kitaoka, M., Fukiya, S., Yokota, A., Leggio, L. L., Hachem, M. A., & Katayama, T. 2019. Evolutionary adaptation in fucosyllactose uptake systems supports bifidobacteria-infant symbiosis. Sci. Adv. 5:eaaw7696.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所寄付講座助成により 行われたものです. この場を借りて厚く御礼申し上げます.

また、ヒト試料の収集にご協力頂いた長尾早枝子博士, 2'-FL, 3-FL, LDFTを譲渡頂いた Glycom A/S, 発現ベ クター pCDF23 を分譲頂いた石川県立大学 中川明講師, B. longum 105-Aを分譲頂いた京都薬科大学 加納康正元 教授,技術的なサポートを行って頂いた京都大学 辺シ オン大学院生,尾島望美 大学院生,デンマーク工科大 学 河口礼佳研究員,本研究内容に関して有益な御助言 を提供頂いた森永乳業株式会社 菅原宏祐研究員に心よ り感謝致します.

文 献

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C. & Zwart, P.H. 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66: 213-221.
- Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H. & Adams, P.D. 2012. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix. refine. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 68: 352-367.
- Andreeva, A., Howorth, D., Brenner, S.E., Hubbard, T.J.P., Chothia, C. & Murzin, A.G. 2004. SCOP database in 2004: Refinements integrate structure and sequence family data. Nucleic Acids Res 32: D226-D229.
- Emsley, P. & Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60: 2126-2132.
- Garrido, D., Kim, J.H., German, J.B., Raybould, H.E. & Mills, D.A. 2011. Oligosaccharide binding proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveal a preference for host glycans. PLoS One 6: e17315.
- Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., Kirmiz, N., Davis, J.C., Totten, S.M., Lemay, D.G., Ugalde, J.A., German, J.B., Lebrilla, C.B. & Mills, D.A. 2016. A novel gene cluster allows preferential utilization of fucosylated milk oligosaccharides in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* SC596. Sci Rep 6: 35045.
- Gotoh, A., Katoh, T., Sakanaka, M., Ling, Y., Yamada, C., Asakuma, S., Urashima, T., Tomabechi, Y., Katayama-Ikegami, A., Kurihara, S., Yamamoto, K., Harata, G., He, F., Hirose, J., Kitaoka, M., Okuda, S. & Katayama, T. 2018. Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. Sci Rep 8: 13958.
- Hehemann, J.H., Correc, G., Barbeyron, T., Helbert, W., Czjzek, M. & Michel, G. 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. Nature 464: 908-912.
- James, K., O'Connell-Motherway, M., Bottacini, F. & van Sinderen, D. 2016. *Bifidobacterium breve* UCC2003 metabolises the human milk oligosaccharides lacto-*N*-tetraose and lacto-*N*neo-tetraose through overlapping, yet distinct pathways. Sci Rep 6: 38560.
- Katayama, T. 2016. Host-derived glycans serve as selected nutrients for the gut microbe: human milk oligosaccharides and bifidobacteria. Biosci Biotechnol Biochem **80**: 621-632.

- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. & Strobel, S. 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. Annu Rev Nutr 20: 699-722.
- Leth, M.L., Ejby, M., Workman, C., Ewald, D.A., Pedersen, S.S., Sternberg, C., Bahl, M.I., Licht, T.R., Aachmann, F.L., Westereng, B. & Abou Hachem, M. 2018. Differential bacterial capture and transport preferences facilitate co-growth on dietary xylan in the human gut. Nat Microbiol 3: 570-580.
- Li, H. & Durbin, R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics 25: 1754-1760.
- Maldonado-Gómez, M.X., Martinez, I., Bottacini, F., O'Callaghan, A., Ventura, M., van Sinderen, D., Hillmann, B., Vangay, P., Knights, D., Hutkins, R.W. & Walter, J. 2016. Stable engraftment of *Bifidobacterium longum* AH1206 in the human gut depends on individualized features of the resident microbiome. Cell Host Microbe 20: 515-526.
- Matsuki, T., Yahagi, K., Mori, H., Matsumoto, H., Hara, T., Tajima, S., Ogawa, E., Kodama, H., Yamamoto, K., Yamada, T., Matsumoto, S. & Kurokawa, K. 2016. A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. Nat Commun 7: 11939.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. & Read, R.J. 2007. Phaser crystallographic software. J Appl Crystallogr 40: 658-674.
- Milani, C., Turroni, F., Duranti, S., Lugli, G.A., Mancabelli, L., Ferrario, C., van Sinderen, D. & Ventura, M. 2016. Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. Appl Environ Microbiol 82: 980-991.
- Milani, C., Lugli, G.A., Duranti, S., Turroni, F., Bottacini, F., Mangifesta, M., Sanchez, B., Viappiani, A., Mancabelli, L., Taminiau, B., Delcenserie, V., Barrangou, R., Margolles, A., van Sinderen, D. & Ventura, M. 2014. Genomic encyclopedia of type strains of the genus *Bifidobacterium*. Appl Environ Microbiol 80: 6290-6302.
- Nakagawa, A., Matsumura, E., Koyanagi, T., Katayama, T., Kawano, N., Yoshimatsu, K., Yamamoto, K., Kumagai, H., Sato, F. & Minami, H. 2016. Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. Nat Commun 7: 10390.
- Niu, B., Fu, L., Sun, S. & Li, W. 2010. Artificial and natural duplicates in pyrosequencing reads of metagenomic data. BMC Bioinformatics 11: 187.
- Sakurama, H., Kiyohara, M., Wada, J., Honda, Y., Yamaguchi, M., Fukiya, S., Yokota, A., Ashida, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K. & Katayama, T. 2013. Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of *Bifidobacterium longum* subspecies *longum*

shows unique substrate specificity and requires a designated chaperone for its active expression. J Biol Chem **288**: 25194-25206.

- Sela, D.A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J.H., Chen, F., Whitehead, T.R., Lapidus, A., Rokhsar, D.S., Lebrilla, C.B., German, J.B., Price, N.P., Richardson, P.M. & Mills, D.A. 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 18964-18969.
- Suzuki, R., Wada, J., Katayama, T., Fushinobu, S., Wakagi, T., Shoun, H., Sugimoto, H., Tanaka, A., Kumagai, H., Ashida, H., Kitaoka, M. & Yamamoto, K. 2008. Structural and thermodynamic analyses of solute-binding protein from *Bifidobacterium longum* specific for core 1 disaccharide and lacto-*N*-biose I. J Biol Chem 283: 13165-13173.
- Terwilliger, T. 2004. SOLVE and RESOLVE: automated structure solution, density modification and model building. J Synchrotron Radiat 11: 49-52.
- Thomson, P., Medina, D.A. & Garrido, D. 2018. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: molecular strategies for their utilization. Food Microbiol **75**: 37-46.
- Urashima, T., Asakuma, S., Leo, F., Fukuda, K., Messer, M. & Oftedal, O.T. 2012. The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. Adv Nutr **3**: 473S-482S.
- Yamada, C., Gotoh, A., Sakanaka, M., Hattie, M., Stubbs, K.A., Katayama-Ikegami, A., Hirose, J., Kurihara, S., Arakawa, T., Kitaoka, M., Okuda, S., Katayama, T. & Fushinobu, S. 2017. Molecular insight into evolution of symbiosis between breast-fed infants and a member of the human gut microbiome *Bifidobacterium longum*. Cell Chem Biol 24: 515-524.
- Yamamoto, S., Wada, J., Katayama, T., Jikimoto, T., Nakamura, M., Kinoshita, S., Lee, K.M., Kawabata, M. & Shirakawa, T. 2010. Genetically modified *Bifidobacterium* displaying *Salmonella*-antigen protects mice from lethal challenge of *Salmonella* Typhimurium in a murine typhoid fever model. Vaccine 28: 6684-6691.
- Yatsunenko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R. & Gordon, J.I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature 486: 222-227.
- Zúñiga, M., Monedero, V. & Yebra, M.J. 2018. Utilization of host-derived glycans by intestinal *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. Front Microbiol 9: 1917.

平成29年度一般研究助成の研究報告

助成期間:平成29年4月~平成31年3月

ナス科植物病原性アルタナリア属菌の 分類および特性評価

染谷信孝

農業・食品産業技術総合研究機構野菜花き研究部門 someyan@affrc.go.jp

目的:ジャガイモの重要病害は疫病,次いでAlternaria solaniによる夏疫病があげられる.現在,疫病抵抗性品 種の育成は進められているが,夏疫病抵抗性品種育成は 進んでいない.そのため,疫病抵抗性品種が普及して殺 菌剤使用を低減した場合,夏疫病被害が増大する可能性 がある.本課題では,ジャガイモ夏疫病発生圃場および 周辺のナス科植物における夏疫病様病徴から病原糸状菌 を単離,同定することを試みた.

方法:ジャガイモ (Solanum tuberosum: St), ミニトマト (S. lycopersicum: Sl), ハリナスビ (S. sisymbriifolium: Ssi), イヌホオズキ (S. nigrum: Sni), テリミノイヌ ホオズキ (S. americanum: Sam), ケイヌホオズキ (S. sarrachoides: Ssa)の病葉から, 各50菌株, 計300株 の糸状菌を分離し, ITS領域塩基配列を決定後, Alternaria属菌株についてクラスタ解析を行った. 代表 株についてgapdh, alt1a, tef1 およびrpb2 配列を決定し, MLST による系統解析を実施した. 北海道十勝地域の殺 菌剤無処理圃場においてジャガイモ品種の夏疫病罹病程 度を調査し, 夏疫病抵抗性を評価した.

結果・考察:6種のナス科植物から単離した糸状菌300 株のうち,ITS 配列および分生子形態から約3分の2が Alternaria 属菌と簡易同定された.クラスタ解析した結 果,大きく2分され,一方は小型分生子,もう片方は大 型分生子を形成する菌株群であった.大型分生子形成ク ラスタのMLST 解析結果から,トマト分離株は Alternaria linariaeと同じクレードに位置し、ジャガイ モ分離株とハリナスビ分離株はA. linariaeと近縁の別ク レードに位置した.ケイヌホオズキ分離株の一部は A. grandis,ハリナスビ分離株の一部はA. protentaと同 じクレードにそれぞれ分かれた.イヌホオズキ,テリミ ノイヌホオズキおよびケイヌホオズキの一部菌株は A. solani-nigri と近縁のクレードに分かれた. この結果, ハリナスビ分離株の一部はジャガイモ分離株と同一種で ある可能性が高いと考えられ,緑肥作物としてのハリナ スビが病原体宿主となる可能性が推測された.また,ジャ ガイモ品種の夏疫病抵抗性を調査した結果,28品種に おける抵抗性程度を判定することができた. その中には 疫病抵抗性が高いにもかかわらず,夏疫病感受性が高い 品種が複数確認された.

冬虫夏草がセミ共生真菌に進化した 遺伝的基盤と生物機能の解明 -寄生菌から共生菌への進化

松浦

優

琉球大学熱帯生物圏研究センター yumatsu@comb.u-ryukyu.ac.jp

目的:多くの昆虫が共生微生物を体内に保持することで 新規な代謝機能を獲得することが知られており,セミ類 は必須アミノ酸を合成する2種の必須共生細菌と共生し て貧栄養な植物導管液に適応している.しかし,セミ共 生細菌 Hodgkinia cicadicola (ホジキニア)のゲノムは 極端に断片化しており,いつ滅ぶかわからない状況にあ る.一方,我々の予備調査により,日本のセミ類には冬 虫夏草に近縁な真菌類が広く感染していることがわかっ ていた.本研究では,セミの共生系の実態を把握するた め,セミ宿主と冬虫夏草を収集し,感染動態,系統,ゲ ノムや生物機能を網羅的に調査して,寄生から共生への 進化を解明する.

方法:日本各地からセミを採集し、共生器官の顕微鏡観 察,DNA抽出を行い、PCRとIlluminaシーケンサーに よる Multilocus sequence typing (MLST) とメタゲノ ム解析により共生微生物の感染や系統学的位置を解明す る.また、セミの共生真菌株の単離培養を試み、PacBio RSIIを用いたゲノム解析により共生真菌とセミ生冬虫 夏草の数株を比較解析してそれらの遺伝的基盤や相違点 を同定する.さらに、イワサキクサゼミの飼育系を立ち 上げ、共生真菌の除去と感染実験によってセミタケ類の IFO Res.Commun. 33 2019

感染機構や機能を解明する.

結果・考察:全国のセミ24種73集団219個体の調査で は、共生細菌 Sulcia muelleri (サルシア) が全種全個体 から検出された.一方、ホジキニアは15種のセミに検 出されず,他9種のホジキニアはゲノム断片化に伴い不 安定な状態にあることが示唆された、次に、セミの共生 真菌を MLST 解析に供した結果、共生真菌はオフィオ コルジセプス属(Ophiocordyceps)のセミタケ類から派 生し、ホジキニアと最低3回以上置換したと推定された. また、セミ10種25集団81個体から共生真菌の単離培養 を試みたが、ツクツクボウシ3集団(つくば、和泉、京 都)のみ成功した。一方で多数のセミ生冬虫夏草試料も 培養と分子系統解析に供したが、共生真菌に近縁な新規 寄生菌株は得られていない. 共生真菌のゲノム解読では、 培養,高分子 DNAの抽出とアセンブルに時間を要した が、ツクツクボウシ共生真菌とセミタケ (O. sobolifera). エゾハルゼミタケ(O. longissima)のNBRC 寄託株に ついて、ゲノム全長25.1~26.7 Mb、7013~7524 個の 遺伝子 (complete BUSCO 98.97-99.3%) を同定し、共 生真菌が共生細菌と同じ必須アミノ酸合成能を有し、ま た寄生性に関わる多くの遺伝子もつことを確認した. 今 後,詳細な比較解析により共生真菌と寄生菌の遺伝的な 違いを明らかにする. セミの飼育実験は2年間の試行錯 誤の結果, 卵採集と短期的な維持は可能となったが, 長 期的な維持にはさらに条件検討が必要である.

土壌環境をモデルにした培養基による 難培養放線菌の分離法の開発と 微生物資源の獲得

松本厚子

北里大学北里生命科学研究所 amatsu@lisci.kitasato-u.ac.jp

目的:環境微生物にとって個々に取り出された実験室環 境と土壌環境では生育条件が劇的に変化する.未利用な 放線菌資源を分離し活用する目的で,自然環境に近づけ た培養条件すなわち土壌中で共存する細菌叢に注目した 優占種菌との共培養による難培養土壌放線菌の分離法を 開発し、微生物資源の拡大を試みる。

方法:土壌希釈液をベンレート(25µg/mL)およびナ リジキシン酸(25 µg/mL)を含む WPA 培地(1.0%プ ロリン, 1.5% 寒天, 水道水, pH 無調整) に混釈し, 27℃にて1週間培養後、出現するコロニーを釣菌した(分 離1). 分離株はYD 培地(1.0%酵母エキス, 1.0%デキ ストロース)にて各々培養後、集菌、洗浄後、リン酸緩 衝生理食塩水に懸濁し、各菌株を混合し菌体混合液を作 製した.この混合液を加えた WA 培地(1.5% 寒天,水 道水, pH 無調整)を大型シャーレの中で固化した. そ の上にメンブレンフィルター(Ø0.45µm)を置き,底 面に穴を開けたガラスシャーレを重ねた. これを培養基 として分離1に用いたのと同一土壌および同一分離培地 を用い、27℃で1-2週間培養し放線菌を分離した(分 離2). 分離株は16SrRNA遺伝子の部分塩基配列に基づ き分類した. 分離に用いた土壌はメタゲノム解析により. 土壌中の細菌叢を調べ分離株と比較した.

結果・考察:2種の土壌(A,B)を用い,22株および 18株の放線菌を分離(分離1)後,土壌ごとに各々菌体 混合液を加えたWA培地上で再度分離を行なった(分離 2).土壌Aからは51株の放線菌を分離し,25種 (*Streptomyces*属20種,希少放線菌3属5種)に分類さ れた.同時に,菌体混合液無添加から分離した30株は, 21種(*Streptomyces*属19種,希少放線菌1属2種)に 分類された.そのうち重複しているのは*Streptomyces*属 7種のみであった.土壌Bからは添加群から100株,24 種(*Streptomyces*属22種,希少放線菌1属2種),無添 加群からは62株,20種(*Streptomyces*属20種)が分離 され,重複種は*Streptomyces*属15種であり,共培養に よる効果があったと推測された.

一方, 土壌AおよびBをメタゲノム解析し細菌叢を 調査した結果, 放線菌 (Actinomycetales 目)の中に占め る Streptomyces 属の割合は約5%および1%に過ぎず, 分離株として得られたのはほんの一部であることは明ら かであった.

共培養により土壌Aより分離した希少放線菌KV-967

は Jiangella 属と近縁であるものの 16S rRNA 遺伝子の相 同性が低く新規放線菌と推定される.また、土壌 B から は共培養のみで希少放線菌が分離され、本方法は実験室 と土壌との環境の違いを少なからず埋めるものであり、 土壌中の未培養放線菌の分離に寄与できると考えている.

菌根を分離源とした菌根性きのこの 遺伝資源拡充:分離源菌根の形態学的特徴の 解明と分離手法の改良

遠藤直樹

鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター endo_nao@tottori-u.ac.jp

目的: 菌根性きのこ種は樹木と外生菌根を形成し、共生 するきのこ種である.本菌群は腐生性きのこ種と比べて 生殖器官である子実体からの分離培養が困難であり、基 礎研究や応用研究の材料となる菌株が殆ど得られていな いのが現状である.本研究では菌根性きのこの栄養器官 である菌根からの分離培養法(菌根分離法)により本菌群 の菌株拡充を試みた.また.菌根を分離源として利用す るため、種同定の基準となる菌根の形態情報を集積した、 方法:国内より菌根性きのこ種の子実体とその直下の土 壌61 試料を採集した. 菌根は実体顕微鏡下で外部形態 を、微分干渉顕微鏡下で微細形態をそれぞれ観察し、同 定した. 同定した菌根は 0.01% Tween 80 水溶液で洗浄 したのちに1%次亜塩素酸カルシウム水溶液で表面殺菌 し、テトラサイクリンおよびストレプトマイシンを 50 mg/L および 100 mg/L 添加した MNC または MA 平 板培地に接種し培養した. 18種20試料では組織分離も 併せて行った. 培養は20℃暗所にて2か月以上行い, 分離株はrDNA ITS 領域の PCR-RFLP 解析および塩基配 列解析によって同定した.

結果・考察: 菌根性きのこ 18 属 49 種 61 試料で菌根分離 を行った結果,7 属 (Amanita, Boletus, Cantharellus, Lactarius, Rhizopogon, Sarcodon, Tricholoma) 18 種 に由来する 19 菌株を確立できた.いずれの菌株も,分 離源の菌根や地上部の子実体と同一の PCR-RFLPパ

ターンを示した. また塩基配列解析の結果, いずれの菌 株も目的とする菌種であることが示された。また、菌根 分離と組織分離の両方を行った10属18種のうち、キハ ツダケ(Lactarius tottoriensis) は菌根分離でのみ分離 株を得ることができた.一方,これら18種には組織分 離でのみ培養できた試料が3属3種.いずれの方法でも 培養できた試料が3属6種、培養できなかった試料が6 属8種あった、以上より、菌根分離法は従来の子実体分 離と併用することで南根性きのこ種の南株拡充に寄与で きると考えられた. 分離源の菌根形態を観察した結果. Amanita 属は節や種によって菌鞘構造が異なったのに対 し. Hvdnum 属は属内で菌根形態が共通する傾向にあっ た. Tricholoma 属も同様の傾向を示したが. 全体の色 調や根外菌糸体の頻度, 菌糸のクランプ結合の有無に種 間で差異が見られた. ゆえに、菌根形態は分類群によっ ては節以下の分類形質となることが示唆された.

地下深部油ガス田におけるメタン 生成機構の解明 - 共生培養法による リグニン関連物質分解微生物の網羅的分離培養

持 丸 華 子

產業技術総合研究所地圈資源環境研究部門 h-mochimaru@aist.go.jp

目的:世界の天然ガス資源に含まれるメタンの約20% は微生物により生産されたと推定されている.地上から 隔絶された研究対象の地下深部天然ガス貯留層中には 100万年以前に堆積した有機物が存在している.堆積物 中で有機物は重縮合を繰り返し巨大な分子量を持つ難分 解性の有機物に変化していると考えられており、メタン 生成へと続く根源有機物の種類やそれを分解する微生物 については明らかではない.そこで本研究では、地下深 部油ガス田におけるメタン生成機構を解明することを目 的とし、国内の様々な油ガス田の試料から、リグニン関 連物質であるメトキシ芳香族化合物を分解する微生物を 網羅的に分離・同定し、その生態を解明する. 方法:国内油ガス田から地層水を採取し、リグニン関連 物質として、メトキシ芳香族化合物を基質として培養を 行った.このメトキシ化合物の分解産物と考えられる水 素や酢酸をメタンに変えるメタン生成菌との絶対共生関 係がメトキシ化合物分解微生物にとって必須であるとい う仮説を立て、水素利用または酢酸利用のメタン生成菌 を添加する共生培養法を用いてメトキシ化合物分解微生 物の集積培養を行った.試験管に水素利用または酢酸利 用メタン生成菌を共生菌として基質と共にあらかじめ添 加し、油ガス田試料の希釈培養を行った.この共生を用 いた希釈培養を繰り返した後、集積された細菌の16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した.

結果・考察:メタン生成菌を添加せずに希釈培養を行っ た系では、ほとんど高希釈率の培地ではメトキシ化合物 の分解が見られなかったのに対し、メタン生成菌を共生 菌として添加した系では、高稀釈率の培地においても良 好なメトキシ化合物の分解が見られた、この結果はメト キシ基の分解とメタン生成が密接な共生関係により成り 立つことを示唆する.集積された細菌について16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析したところ、採取地や培養 温度などが異なる複数の試料から、既知種との相同性が 90%以下の細菌が40-100%の存在率で検出された.こ の中で既知種との相同性がそれぞれ88-90%と離れてい る新規微生物は5種類以上確認され、共生培養法が未知 のメトキシ化合物分解微生物の培養に有効であることが 確認できた、本研究により、深部地下油ガス田において メトキシ芳香族化合物がメタン生成菌との強固な共生に より分解されメタンへと変換されているという新しい生 態が示された.



目的:日本産広義Alternaria 属菌と Pseudocercospora 属 菌の包括的分子系統樹を分類学上,信頼に足る分離株を 用いて作成し,それらの結果と形態,宿主範囲といった 複数の要素を組み合わせることにより,統合的に種概念 を再検討する.これにより分類学上の成果を得るととも に,種バーコーディングや迅速検出技術の開発等の実用 場面においてそれらの成果を応用することを目的として 開始した.

方法:重要な植物病原菌で宿主特異的毒素産生能を有する *Alternaria alternata* strawberry pathotype および Japanese pear pathotype を中心に形態と多遺伝子座 (ITS, gapdh, rbb2, tef-1a, alt a1, endoPG)の分子系統, 接種試験 による宿主範囲、および毒素産生菌による病変形成の有 無を統合した種概念を検討した.また.毒素産生遺伝子 の一部塩基配列を参考に LAMP 法用特異的プライマー を設計した. Pseudocercospora 属菌については4遺伝子 座 (ITS, act, tef-1a, rpb2) による解析を行った. 結果・考察:日本産広義Alternaria 属菌 110株 32 種の6 領域を解析して分子系統樹を得た. A. alternata は同一 種内で宿主植物に対して特異的毒素(HST)産生能を 有する系統と欠く系統が存在する等. 多様性に富むが. 形態, 宿主範囲, 毒素産生能を統合して解析した結果, 宿主特異的毒素産生系統と非産生系統の間には種レベル での分化が見られ.このことから、毒素産生系統を Alternaria gaisen Nagano ex Bokura とすることを提案し た.加えて、このA. gaisenの宿主特異的毒素産生系統 を非産生系統から明瞭に区別することが実用上重要であ ることから、毒素産生遺伝子の部分配列を用いて LAMP 法用プライマーセットを設計し、毒素産生菌の特異的識 別に成功した、この手法を更に発展させ、LAMP-FLP法 によるコムギ赤かび病 (Fusarium graminearum) の薬 剤抵抗性系統を特異的に検出可能なシステムを開発し公 表した. 一方. 植物病原菌である Pseudocercosbora 属菌 はやはり多様性に富み、分子系統関係も明らかになりつ つある.本研究では、従来用いられてきた多遺伝子座に 変えて新たな組み合わせ(ITS, act, tef-1a, rpb2)によ る分子系統解析により、東・東南アジア産(日本、台湾、

韓国,マレーシア,タイ)の数多くのPseudocercospora種の分子系統関係を明らかにし,あらたな種バーコード領域

を提案した.さらには、これらの種分化が、宿主植物の 分化や地理的な分化と密接に関連することが示唆された.

昭和期に記載された稀産シクエストレート菌の 実体解明と保全対策の再検討

折原貴道

神奈川県立生命の星・地球博物館学芸部 t_orihara@nh.kanagawa-museum.jp

目的:トリュフ類やショウロのように,子実体(きのこ) が外皮に覆われたまま成熟し,自力での胞子散布ができ ないシクエストレート菌(地下生菌)は,担子菌類や子 嚢菌類の多岐にわたる系統から平行進化してきたことが 知られている.日本におけるこれらの菌の基礎的研究は 近年急速に進展しており,その高い多様性は世界的にも 注目を集めている.しかし,昭和期に今井三子(1900-1976),小林義雄(1907-1993),吉見昭一(1928-2003) らの菌学者により散発的に記載された種については,実 体が不明なままであるものが多い.本研究では,これら 過去に記載された「幻」の菌の実体を明らかにし,国内 のシクエストレート菌の分類学的基盤を構築することを 目的とした.さらに,実体が明確でないまま希少種・絶 減種とされてきた菌について,保全に資する基礎的知見 を集積することを目指した.

方法:昭和期に活躍した菌類研究者により記載もしくは 記録されたシクエストレート菌について、タイプローカ リティを含む過去の記録産地での野外調査や国内各地の ハーバリウムにおける標本調査を実施した.得られた標 本の分類学的再検討を行うとともに、一部については核 リボソーム RNA 遺伝子等の領域に基づく分子系統解析 も行った.

結果・考察:本研究により得られた主要な結果は以下の 通りである.

スナタマゴタケ(Chlorophyllum agaricoides)は1930年 に小樽市の海岸で一度採集されて以降,国内では記録が 無く,環境省レッドリストでは「絶滅」に指定されている. この国内唯一の標本はおよそ20年前から所在不明となっ ていたが、今回、菌蕈研究所(鳥取市)にて探索を行った結果、この国内唯一の標本を再発見することができた.

ハハシマアコウショウロ (*Circulocolumella hahashimensis*)は、1936年11月に小笠原諸島母島で採集され、 翌年記載されて以降再発見例は無く,*C. agaricoides* 同様、 環境省レッドリストで絶滅種に指定されている.今回、 現地での子実体探索調査やハーバリウム収蔵資料の調査 を実施した結果、本種の実体解明に繋がる有力な形態学 的知見が得られた.

ニカワショウロ(Protuberella borealis)は1938年の 記載以降,長らく記録が無く,実体が明確でなかった. 本種は1990年代以降に再び発見されるようになったが, これらは元来のニカワショウロと形態的に大きく異なっ ている.この「通称ニカワショウロ」の系統解析を行っ た結果,既知種とは属レベルで異なる,未知系統の菌で あることが示された.

1930年代に小笠原産の標本を基に記載されたオオショ ウロ (ムニンショウロ)の学名と和名を再検討するとと もに、レクトタイプ指定を行った.さらに、本種が日本 本土や南西諸島,中国大陸に広く分布することを示した.

南方熊楠が遺したシクエストレート菌の原画・標本資料計11点を直接観察し,分類学的検討を行った. その結果,ショウロ属菌や,2016年に著者により記載された Rossbeevera paracyanea などに同定された.

雪氷環境における好冷性微細藻類の 共生細菌 Hymenobacter nivisの ゲノム解析及び代謝機構の解明

寺 島 美 亜

北海道大学低温科学研究所 m.terashima@lowtem.hokudai.ac.jp

目的:氷河や高山雪原では雪解けが進む春,雪の表面を ピンクに染める赤雪現象が起こる.この現象は藻類増殖 によるものであり,低温,強光,高紫外線,低栄養,凍 結による乾燥などのストレス下においても藻類が生育し ている.赤雪には微細藻類のほか,細菌も検出されてお り, 藻類が生産した有機物を消費していると思われる. 南極の赤雪からは真核緑藻と一緒に従属栄養性細菌の Hymenobacter nivisが特異的に検出されている.本研究 では, H. nivisにおける南極赤雪の厳しい環境への適応 メカニズムの解明を目的とした.

方法:南極の微細藻類による赤雪から単離された H. nivis P3 株について次世代シーケンサー PacBio でゲ ノム配列解析を行った. H. nivis P3 株を5℃および 15℃でR2A培地上で培養し,明暗状況下での生育を比 較した.フローサイトメトリーにより,2日おきに培養 液内の細胞数を正確に測定し,成長曲線を作成した.明 暗状況(5℃)で培養した H. nivis の細胞外高分子物質 の総炭水化物をフェノール硫酸法で定量した.同様に, 総タンパク質をBCA法で定量した.次に,ゲノム上確 認された遺伝子の発現を調べる為,明暗状況(5℃)で 培養した H. nivis P3 株のプロテオームをオービトラッ プ型質量分析装置で測定した.

結果・考察:H. nivis P3 株の約 500 万塩基ゲノム配列に は4604の遺伝子が予測され、光に反応するタンパク質 (プロテオロドプシン、フィトクロム、フォトリアーゼ、 クリプトクロム)の遺伝子が含まれていることが明らか になった. さらに, 明暗環境下で本菌の増殖を比較をす ると、5℃及び15℃共に明環境下の方が速く、静止期の 細胞数も明環境下の方が多かった. H. nivis P3株がプロ テオロドプシンなどのタンパク質により光エネルギーを 利用し、成長を促進させていると考えられる。また、明 暗環境下の細胞外高分子物質の分析を行った結果、総炭 水化物と総タンパク質は共に暗環境下の方が多いことが わかった.次に、H. nivis P3株のプロテオームを解析し たところ、光反応タンパク質が発現されていることが明 らかになった. プロテオロドプシン.フィトクロム.フォ トリアーゼ、クリプトクロムの発現が明暗環境下で確認 できた. 光反応タンパク質が暗環境でも発現されている のは、常に光を認識し利用できる状態を保つためだと思 われる.こうしたタンパク質を発現することによって, H. nivis は南極赤雪の低温・強光環境に適応し、優占し ていると考えられる.

河川水の自由生活性アメーバ内の 非結核性抗酸菌を分離して 共生関係の実態を解明する

西 内 由紀子

大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所 nishiuchi@med.osaka-cu.ac.jp

目的:肺非結核性抗酸菌感染症は世界中,特に日本で著 しく増加している.環境から感染する抗酸菌感染症が世 界中で増えている事実は,環境中の抗酸菌が生存域を拡 大している可能性を示唆している.生存域の拡大には, 単独で浮遊する以外にバイオフィルム形成や自由生活性 アメーバ(アメーバ)内共生が寄与していると考えられ るが,その実態は不明な点が多い.本研究では河川表層 水中の浮遊菌とアメーバ内の抗酸菌について,培養法と 抗酸菌現存量,および菌叢を比較解析して共生関係の実 態を調べた.

方法:淀川, 猪名川, 石川の3~6ポイントから毎年夏 季と冬季の2回表層水を1L採取して,0.8µm 孔径のフィ ルター上に残った試料をアメーバ試料,0.8µm 孔径の フィルターを通過し0.2µm 孔径のフィルター上に残った試 料を浮遊菌試料とした.試料を2分し,培養とDNA抽出 に供与した.培養試料はアルカリ処理後にMiddlebrook 7H11寒天培地で4週間培養し,得られた分離株の*rpoB* の配列を基に97%相同以上で菌種同定した.得られた *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH)株で は縦列反復配列多型解析を行った.DNAはDNeasy PowerWater kitを用いて抽出し,*atpE*を指標とした定 量 PCR法,および16S rRNA遺伝子のV3-V4領域を対 象とした菌叢解析を行いQIIMEで解析した.

結果・考察:浮遊菌試料を培養するとMAH, M. intracellulare, M. colombiense, M. arupense, M. shigaense な どの病原性および非病原性の多様な抗酸菌を20種以上 分離した.河川や採水ポイント,季節による特徴は認め られなかった.分離した MAH 17株を縦列反復配列多型 解析したところ,患者や浴室由来株が多いクラスターに 11株, 豚由来株が多いクラスターに6株分布した.河 川表層水中の MAH は多様性を示し満遍なく分布する特 徴を示した. アメーバ試料からは, Naegleria koreanum, Naegleria neojejuensis, Stenamoeba limacine, Vermamoeba vermiformis を分離した.分離アメーバから生きた抗酸 菌は分離できなかったが、抗酸性染色をするとアメーバ 内に抗酸性染色陽性菌が認められた. 定量 PCR 法で抗 酸菌数を定量したところ、浮遊菌およびアメーバ試料の いずれも菌が認められ、最大 3.8×10⁵ コピー/500 mL で あった.検体間の菌叢の違いを主座標分析したところ. 浮遊菌試料とアメーバ試料間.および採取した季節によ りクラスターを形成した.また、菌叢解析結果より細胞 内寄生菌を抽出してその分布をアメーバ試料と浮遊菌試 料間で比較したところ, Mycobacterium はアメーバ試料 で多く認められた. 定量 PCR による結果と合わせて河 川表層水において抗酸菌は浮遊するだけでなく、表層水 中のアメーバとも関わりあって生存していることが示唆 された、今後アメーバ試料から抗酸菌を分離して浮遊菌 由来抗酸菌との違いを検討したい.

外来雑草エゾノギシギシを摂食する コガタルリハムシの腸内シュウ酸 分解細菌の共生機能の解明

大 坪 和香子

東北大学大学院農学研究科 wakako.ohtsubo@tohoku.ac.jp

目的:外来雑草エゾノギシギシは高濃度のシュウ酸を含 むことから,多くの動物や昆虫にとって有害である.し かし,日本の在来昆虫であるコガタルリハムシは,幼虫 および成虫共にエゾノギシギシを旺盛に摂食し,さらに 体内にはシュウ酸が蓄積していないことが知られてい る.本研究では,ハムシ腸管に共生する細菌のシュウ酸 分解能力に着目し,その特徴や共生機能について明らか にすることを目的とした.

方法:コガタルリハムシ幼虫腸管および体液からの細菌 の単離およびシュウ酸資化性試験は,10または20mM のシュウ酸を添加した2種類の半合成培地および6種類 の栄養培地を用いて行った.ハムシ腸管・体液および単 離菌株 DNA は,SK ミルによる破砕後 DNeasy キットを 用いて抽出し,16S rRNA 遺伝子の配列決定による菌種 同定および菌叢解析(V3-V4 領域)に使用した.単離 菌株 ML5 および R102 のゲノム配列決定は,Illumina MiSeq を用いて受託解析により実施した.ハムシ腸管 に共生する細菌の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション は,whole-mount FISH 法を用いて行った.

結果・考察:野外環境および飼育環境由来のコガタルリ ハムシ腸管内容物および体液を塗布したシュウ酸含有培 地および栄養培地に生育したコロニーを70個単離した. その結果、シュウ酸を含む培地では、16S rRNA遺伝子 による細菌叢解析においても優勢的であった Rahnella 属および Pantoea 属の近縁細菌がそれぞれ優勢的に見出 され、シュウ酸分解能も有していた、このことから、コ ガタルリハムシには生育環境に由来するシュウ酸分解細 菌が優勢的に共生していることが知られた. 優勢種の代 表菌株である Pantoea sp. R102 株のドラフトゲノム解析 の結果、シュウ酸脱炭酸酵素遺伝子の配列が見出された が. Rahnella 属に近縁(未培養グループ)のML5株の ドラフトゲノム配列からは既知のシュウ酸分解遺伝子は 見出されなかった.興味深いことに, 16S rRNA 遺伝子 の BLASTn 検索および系統解析の結果、本研究におい てコガタルリハムシから単離されたシュウ酸分解細菌株 の30%以上が、カメムシとの共生能力を持つことが報 告されている環境細菌と最も高い相同性を示し、特に R102株については、ゲノムの各遺伝子の配列の多くが カメムシ共生細菌である Symbiont C ゲノムの相当遺伝 子配列と99~100%の相同性を示した. 今回単離した細 菌の獲得・共生と宿主の生存との関連性については、単 離菌の感染・除去実験により検討中であるが、本研究の これまでの結果は、コガタルリハムシに共生するシュウ 酸分解細菌が、カメムシにおいて報告されているような 「環境中から獲得され宿主の生存に寄与する」共生機能 を有する可能性を示唆している.

酸化還元電位制御下でのコロニー形成 「固相電気培養装置:SPECIES」で拓く 培養可能微生物圏のフロンティア

木 村 善一郎

呉工業高等専門学校環境都市工学分野 z-kimura@kure-nct.ac.jp

目的:廃棄物系バイオマスは現在主としてメタン・水素 等の燃料用途としてリサイクルが検討されているが、今 後の再生可能資源の利活用の拡大のためには、より高付 加価値な炭化水素を生産するプロセスを開発していく必 要がある. 筆者は細胞外に存在する電子を直接的にエネ ルギー源とする細菌(電子資化性細菌)を物質生産触媒 として用いる高付加価値物質の生産系の構築に取り組ん でいる. 電子資化性細菌は様々な物質生産系を構成し得 る有用な細菌群であるが特異的培養法が確立されておら ず、その確立は当該細菌分離のスループットを向上させ 得る.筆者は、自身の独自技術である固相電気培養装置 (Solid-Phase Electrichemical Colonization and Isolation Equipment System; SPECIES)が、当該細菌群の分離装 置として使用できると着想し, 嫌気環境試料を植種源と する電子資化性細菌の分離培養可能性、および実際の分 離培養により得られた細菌群の系統分類に取り組んだ. 方法:SPECIESは培地に対しカーボンナノチューブ (CNT) を添加した導電性固体培地による培養装置であ る. 無機栄養培地に水ガラス (ケイ酸ナトリウム) 10% 及びCNT分散水溶液(終濃度0.01%)を添加し塩酸滴 定によるゲル化で固体培地とし、ここに-400mV(vs Ag/AgCl。) 陽極を作用極としてポテンショスタット を 用いて電圧印加した. 培地は電圧印加系と非印加対照系 を作成し、両者に環境試料(八橋油田油層水)を滴下し、 嫌気状態で1ヵ月培養した. 培養後のコロニー菌叢は次 世代シーケンサにより解析・比較した.

結果・考察:SPECIES装置内に形成された菌叢は植種 源と明確に異なった.電極印加による大きな影響として, 培地上に形成されるコロニーの多様性が高まることが判 明した.電圧印加系においては,0.5%超の検出頻度となっ

た属が20以上存在したのに対し、非印加系では11属にと どまった. また印加系から得られたコロニーには種レベ ルで新規と考えられる Proteobacteria 門に属する株が含 まれており、当該株群については現在電子資化性調査及 びゲノム解読を実施中である.またこのことは電極印加 による培養化の可能性を示唆した. すなわち. SPCEIES は培養可能微生物圏を拡大し得る培養技術であることが 判明した. またコロニー菌叢の優占種は, 電子資化性細 菌であることが示唆されている Thermoanaerobacter 属 だった. 従って本研究により SPECIES の持つ電子資化 性細菌培養装置及び菌体細胞培養化装置という性質が明 らかとなった、以上の成果について現在論文執筆中であ る.一方で、現状として本技法は、電子資化性細菌を除 く一般的な細菌の培養可能性をも拡大する可能性があ り、今後の課題として「培養性の拡大」及び「電子資化 性細菌培養の特異性向上 | の2つの指向性を切り分け、 新規微生物培養装置,電子資化性細菌特異分離装置,そ れぞれの方向性に合致する装置運用条件を検討する必要 がある.

藍建て発酵に関与するインジゴ還元酵素の 機能と構造解析並びに染色への応用

米田一成

東海大学農学部 kyoneda@agri.u-tokai.ac.jp

目的:日本の伝統産業である藍染めは藍と呼ばれるタデ 科植物の葉を発酵させたスクモを原料に用いて,常温高 アルカリ条件下での発酵還元により作られる.微生物に よるスクモ還元は古来より行われていたが,その実態は ほとんど不明であり,職人らの経験と勘に基づいて作業 が続けられてきた.そのため同一原料・同一操作に因り ながら還元力の異なる染色液ができ,その品質管理が困 難な事が報告されている.これまでに藍染め染色液より インジゴ還元酵素を生産する常温性の好アルカリ性菌の 単離や部分精製酵素の機能解析例はあるものの,酵素の 不安定性の問題からインジゴ還元酵素の詳細な機能は未 だに不明である. そこで,本研究ではインジゴ還元活性 を有する好熱性 *Bacillus* 属細菌である, *Bacillus smithii* に着目し,日本の伝統産業である藍建てにおけるインジ ゴの還元過程を生化学的視点から解明することを目的と している.

方法: B. smithiiのゲノム情報からインジゴ還元酵素遺 伝子を同定し、遺伝子合成を行った.遺伝子合成後、 pET15bベクターにクローニングした.その後、大腸菌 BL21コドンプラスを用いて IPTG による遺伝子発現を 行った.補酵素の同定にはTLCを用い、UVによって補 酵素の検出を行った.酵素活性は窒素ガス存在下におけ る 610nmの減少を測定した.結晶化は 42mg/mlに濃縮 した酵素を用いシッティングドロップ蒸気拡散法を用い て、20℃で結晶化を行った.また、藍染め染色実験に は田中直染料店のインジゴ還元顆粒を使用した.

結果・考察:遺伝子発現産物はコバルト親和性カラムで 精製を行い、嫌気条件下においてインジゴカルミン(水 溶性インジゴ)の還元活性(30U/mg)を有しているこ とを明らかにした、補酵素の同定を行った結果、本酵素 はFMNを補酵素としていた.酵素化学的性質を決定し た結果,本酵素の最適 pH は 7,最適温度は 70℃以上で あり、pH 5~11の広い範囲で安定であり、100℃でも 失活しない高度耐熱性の新規なインジゴ還元酵素である ことがわかった. インジゴカルミンに対する Km 値は 6.9μM, NADH に対する K_m値は 157μM であった.また, わずかではあるが本来の基質であるインジゴに対する反 応性も280-700nmのスペクトル測定を行うことで確認 することができた.しかし、本来の基質であるインジゴ に対する還元活性は非常に低かった. インジゴ還元顆粒 とインジゴ還元酵素を使用した藍染め染色実験で綿布の 染色を比較したところ。0.1%のインジゴ還元顆粒の使 用条件で,還元剤の有無による染色の差が確認できた. また、PEG600を沈殿剤としてFMN-酵素複合体の単結 晶が得られたため、X線回折実験を行い、1.9Å分解能 で立体構造を決定した.

がん幹細胞選択的な細胞毒性を示す 植物成分の微生物生産に向けた研究

齧

光

大阪大学大学院工学研究科 hseki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

目的:グアイアノライドセスキテルペンラクトン (GSLs)は5員環-7員環-ラクトン環が縮合した基本 構造を持つ植物セスキテルペノイドの一グループであ り,抗ガン活性を示すアルグラビンやミケリオリドなど の化合物を含む.幾つかのGSLは急性骨髄性白血病幹 細胞に対する選択的細胞毒性を発揮することから注目さ れている.本研究では,組換え酵母を用いたGSL生産 に向けた基盤研究として,GSL生合成に関わる酵素遺 伝子の探索と組換え酵母におけるGSLs生合成経路の再 構築を目的とした.

方法:ジンチョウゲ科シャムジンコウ由来のセスキテル ペン環化酵素 (δ-guaiene 合成酵素), レタス由来シト クロム P450 モノオキシゲナーゼ (CYP71AV3), クソニ ンジン由来アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH1)およ びアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH1) をコードする 遺伝子を単離し、セスキテルペノイドの共通前駆物質で あるファルネシル二リン酸を高生産する Saccharomyces cerevisiae (EPY300株) に導入した. 導入遺伝子の発現 を同時に誘導することで、組換え酵母内でGSL基本骨 格の前駆体となりうる δ-guaianoic acid を de novo 合成 した. 次に、 δ -guaianoic acid を基質としてラクトン環 形成を誘導しGSL基本骨格を生成しうる酵素遺伝子の 候補として、シナジンコウの GSL 産生部位である agarwood partにおける発現量が著しく高い6種のCYP71 ファミリーP450 (AsCYP-1~6とする), また, Thapsia garganicaの根において発現する3種のP450を選抜した. これらの遺伝子を人工合成し、 δ -guaieneならびに δ -guaianoic acid 生産酵母に導入した.酵母培養液抽出 物をガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)に供 するとともに、生成物の一部については単離および NMRによる構造決定を行った.

結果・考察: $AsCYP-1 \sim 6$ のそれぞれを導入した酵母培 養液抽出物のGC-MSの結果,3種のP450が δ -guaiene に対する酸化活性を示した.生成物の構造解析の結果, AsCYP-1は13-hydroxy- δ -guaieneを,AsCYP-2は新規 化合物である11,12-epoxy-7-hydroxy- δ -guaieneを生成 物として与えることが判明した.AsCYP-3ならびに *T. garganica*由来の3種のP450については、いずれも上 記と異なる δ -guaiene酸化物を生成物として与えること が判明したため、単離と構造決定を進めている.一方、 いずれの酵素についても目的とするラクトン環形成誘導 活性については検出されなかったため、さらなる候補酵 素遺伝子の探索が必要である.

高変異性好熱菌を利用した耐熱化 変異酵素のハイスループット創出

鈴木宏和

鳥取大学大学院工学研究科 hirokazusuzuki@tottori-u.ac.jp

目的:実用的な耐熱化変異(安定化)酵素を得るには, その遺伝子のランダム変異ライブラリーを構築し,耐熱 化変異に成功した遺伝子をスクリーニングする手法が古 くから用いられてきた.しかし,スクリーニングについ ては簡便な方法が確立されておらず,耐熱化変異酵素の 創出は決して容易な作業ではない.耐熱化変異酵素創出 のハイスループット化を目的とし,本研究では耐熱化変 異酵素遺伝子を好熱菌(*Geobacillus kaustophilus*)中で 簡単にスクリーニングする手法の開発を目的とした.

方法:1つ目の手法は,好熱菌中で熱変性タンパク質が 蓄積した際に発現が変動する遺伝子をレポーティングす る方法で,そのような遺伝子をトランスクリプトーム解 析により見出した.これら遺伝子のプロモーター領域下 流に黄色蛍光タンパク質の遺伝子を連結し,モデル酵素 遺伝子(非耐熱性酵素BSPryF_Aや耐熱性変異酵素 BSPryF_vなど)と共に好熱菌中で発現させ,その際の 酵素耐熱性とレポーター発現量の相関性を評価した.ま たβ-ガラクトシダーゼ(BgaB)をレポーターとした場 合も解析した.2つ目の手法として,熱変性タンパク質 の蓄積が好熱菌の生育を阻害する可能性を検証した.モ デル酵素遺伝子を好熱菌内で高発現させ,増殖曲線を解 析することで,細胞内で産生される酵素の安定性と増殖 速度の関係性を評価した.

結果・考察:熱変性タンパク質の蓄積により発現量を上 昇させるプロモーターを2つ見出した. これらの下流に 黄色蛍光タンパク質遺伝子を配置し、BSPrvF。と BSPrvF_vの遺伝子と共に好熱菌中で発現させたが、明 確な差異は見られなかった、黄色蛍光タンパク質が高温 培養下において熱変性したため、プロモーターの応答が 複雑化した可能性を考慮し、レポーターを耐熱性の高い BgaBに変更した. BgaBは蛍光タンパク質よりも高感 度に検出できるため、プロモーターと bgaB 遺伝子から なるレポーターカセットを好熱菌染色体に導入した.得 られた株中でBSPryF₄とBSPryF_yを高産生させたとこ ろ.いずれのレポーター株においても期待通りの bagB 発現変動(BSPryF_A生産株で高く,BSPryF_v生産株で 低い)が見られた.2つ目の手法は、BSPryF₄生産株と BSPryFy 生産株の増殖曲線を用いて評価した. これら 両株は同様な倍加時間を示したが、増殖開始時間(準備 期)において差異があり、BSPryFy 生産株はBSPryFa 生産株よりも早く増殖を開始した.熱変性タンパク質の 蓄積が負荷となり、増殖開始を遅らせた可能性が考えら れる.いずれの手法も酵素活性に依存することなく耐熱 化変異酵素を選別できる汎用的スクリーニング法に発展 すると期待できる.



東京大学大学院薬学系研究科, 現神奈川大学工学部 okada@kanagawa-u.ac.jp

目的:翻訳後修飾によりトリプトファン残基がイソプレ ニル化されたオリゴペプチド型クオラムセンシングフェ ロモン(ComX フェロモン)を初めて発見したが,今の ところ,存在を確認できているのは枯草菌7菌株のみで ある.そこで,腸内細菌を含めた様々な細菌にも同種の フェロモンが分泌されていること,宿主(ヒト)に対し ても何らかの生理活性を示すことを明らかにする目的で 研究を行った.

方法:ペプチドフェロモンを直接探索することは困難で あるため,生合成遺伝子に着目したゲノムマイニングを 行った.ComXのイソプレニル化酵素ComQを指標に した相同性検索により、クロロフレクサス門の細菌 *Sphaerobacter thermophilus* 由来の*sthQ*遺伝子が検出さ れ、すぐ隣にはC末端から2、3番目にトリプトファン 残基を有する短鎖ペプチドをコードする*sthX*遺伝子が 存在した.そこで,*sthQX*遺伝子クラスターのクローニ ングを行い、SthQ,SthXを得た後に、SthQおよび Mg²⁺イオン存在下,ドナー基質であるファルネシル二 リン酸とSthX との反応を行った.さらに、SthQのX線 結晶構造解析を行った.

結果・考察:反応液をLC-MS/MSを用いて分析した結 果. SthXのC末端から10残基に相当し、C末端から2 番目のトリプトファン残基がファルネシル化された修飾 デカペプチドが検出されたことから, SthQ がトリプト ファン残基のファルネシル化酵素であることが証明され た. 続いて、SthQ単独であるアポ体の結晶と、ドナー 基質のミミックであるファルネシルチオニリン酸との複 合体の結晶について構造解析を行った結果、両者の構造 はほぼ一致した. これは、二箇所の基質結合部位付近に 通常なら存在するループ構造が短い、もしくは存在しな いためであると考えられた. この特徴はSthQが構造的 に大きなペプチドを基質として受け入れること, ComQ が基質許容性の極めて高い酵素であることを合理的に説 明できるため、トリプトファン残基のイソプレニル化酵 素の特徴と言える. ComQと相同性のある約 30,000 種 類のタンパク質のうち, SthQ と同じ特徴を有するもの を選別した結果,300種類程度のホモログが検出された. 興味深いことに、その中に ComQ や SthQ は含まれてい たが、既知の酵素は全く含まれていなかった.また、枯 草菌が属するフィルミクテス門やクロロフレクサス門に 加え、放線菌門、シアノバクテリア門細菌からも、トリ プトファンイソプレニル化酵素のホモログが見つかっ た.以上の結果から、翻訳後修飾によるトリプトファン 残基のイソプレニル化は様々な細菌に広く見られる翻訳 後修飾の一つである可能性が極めて高いと考えられた.

基質多様性を有するアデニル化酵素の探索と D-アミノ酸ジペプチド生産法の開発

木野邦器

早稲田大学理工学術院先進理工学部 kkino@waseda.jp

目的:ジペプチドは、構成するアミノ酸単体には見られ ない生理活性や物理化学的特性を有し、医薬品原料、健 康食品、化成品原料などとしてその用途は拡大している. 一方、乳酸発酵製品や醸造食品の中に遊離のD-アミノ 酸の存在と呈味性などが報告されており、キラリティの 異なるD-アミノ酸から成るジペプチドにも新たな機能 や特性が存在する可能性が期待できる.本研究では、我々 が開発したユニークな反応システムを利用したD-アミ ノ酸含有ジペプチドの合成法の高度化を目指し、合成可 能なD-アミノ酸ジペプチドの拡張を検討した.

方法:これまでに、非リボソーム型ペプチド合成酵素の アデニル化ドメイン(Aドメイン)による基質アミノ酸 のカルボキシ基のアデニル化と、一方の基質アミノ酸の アミノ基による非酵素的な求核置換反応を組み合わせる ことで、アミド結合形成が起こり、ジペプチドが生成す ることを見出している.後段の求核置換反応は非酵素的 であるがゆえにD-アミノ酸を含む多様なアミンとアミ ド結合を形成し、広範なD-アミノ酸を含むアミド化合 物が合成可能である.一方、前段のD-アミノ酸をアデ ニル化し得るAドメインの基質特異性が広がることで 合成可能なD-アミノ酸ジペプチドが拡張できるため、 D-アミノ酸をアデニル化可能な新規Aドメインの探索 を行った.

結果・考察:D-アミノ酸をアデニル化可能なAドメイン

はほとんど報告されていない. そこで、二次代謝産物生 合成機構において基質アミノ酸の立体反転を担うエピメ リ化ドメインの存在を手がかりとして、新たに取得した 5つのAドメインと研究室で保有していたものを含め計 6つのAドメインの評価を行った. その結果, Tyrocidine synthetaseのAドメインTycA-AがD-Trp, D-Tyr, D-Phe, D-Met, D-Leu, D-Alaを, Bacitracin synthetaseのAド メイン BacB2-A と Paenibacterin synthetase のAドメイン PbtA1-A および PbtB2-Aの3つのAドメインが D-Lysを 基質とすることを見出した.次に、TycA-AとBacB2-A をモデルにジペプチド合成を検討した. その結果, DD-, DL-, LD-体といった多様なキラリティのジペプチド, さらにはC末端に任意のD-アミノ酸を有する40種類以 上のジペプチドの合成が可能であることを明らかにし た. 組換え大腸菌によるジペプチド合成を検討した結果, 10mMのD-Trpから最大4.67mMのD-Trp-D-Proの合成 を達成した.

以上, D-アミノ酸を基質とするAドメイン探索に対 する作業仮説の妥当性を示すことができ,その結果,多 様なD-アミノ酸ジペプチドの効率的合成も可能となり, 我々が開発した新規アミド結合反応システムの有効性を 実証することができた.

メディエータレス酵素機能電極用素子を 志向した直接電子移動型色素依存性 脱水素酵素の探索と機能解析

里村武範

福井大学学術研究院工学系部門 satomura@u-fukui.ac.jp

目的:色素依存性脱水素酵素(Dye-DH)は人工酸化還 元色素存在下でアミノ酸,有機酸,糖などの各種生体成 分の酸化反応を触媒する一群の酵素である.本酵素は, 人工の酸化還元色素をメディエータとすることで基質の 電子を電極へ導入することが可能である.近年,この Dye-DHの中に,メディエータを必要とせず酵素-電極 間で直接電子授受が可能な直接電子移動(DET)型 Dye-DHが見出され注目されている. DET型Dye-DHは, 酵素内に基質の酸化反応を行う触媒部位と電極へ電子授 受が可能な鉄などを含む酸化還元部位の二つの反応部位 から構成されている. この DET 型 Dye-DH は. 酵素-電極間での電子授受を介するメディエータを必要とせ ず、直接電子の授受を行うことが可能であるため、生体 成分を起電力とするバイオ電池やバイオセンサなどの酵 素機能電極用素子としての応用利用が期待されている. しかしながら、DET型 Dve-DHは、これまで常温性生 物由来酵素の報告例しか無く、酵素自体も不安定である ため酵素機能電極用素子としての利用は困難である.本 研究では、安定性の高い酵素の報告例が多い超好熱菌か ら DET 型 Dye-DHを探索し,超好熱性アーキアを宿主 とした組換えタンパク質発現系を用いて DET 型 Dye-DH の発現と酵素の機能解析を進めることを目的とした. 方法:超好熱性アーキアのゲノム情報より基質を酸化す る触媒活性部位とヘムや鉄硫黄クラスターなどの第二の 酸化還元部位特有のモチーフを持つ遺伝子を検索し DET 型 Dye-DH 候補の抽出を行った. DET 型 Dye-DH 候補遺伝子について好熱性アーキアタンパク質発現系を 用いて、組換えタンパク質の発現、精製を行いタンパク 質の同定を行った.

結果・考察:KEGGゲノムデータベースよりDET型 Dye-DH 候補遺伝子を探索したところ4種の超好熱菌か ら6つのDET型Dye-DH 候補遺伝子を見出すことがで きた.これらDET型酵素候補遺伝子について、アーキ アを宿主とする組換えタンパク質発現ベクターにそれぞ れ導入しSulfolobus acidocaldarius内で組換えタンパク 質の発現を行った.これら候補遺伝子の発現産物の酵素 活性を測定したところL-プロリン、D-乳酸、L-乳酸を 基質とするDye-DH活性が確認できた.そこで、酵素を 電極上に修飾しメディエータを添加せずに電極反応の測 定を行ったところ、電極触媒反応を確認することができ た.このことから、今回見出した超好熱菌由来酵素は電 極上でDET反応を行えることが明らかになった.今後 は、このDET型酵素を用いてバイオエレクトロニクス デバイスを構築していく予定である.

酵母における S-アデノシルメチオニンの 生理機能に関する研究

水沼正樹

広島大学大学院統合生命科学研究科 mmizu49120@hiroshima-u.ac.jp

目的:老化は遺伝的・時間的・環境因子など様々な要因 が関係しており多様複雑であると考えられてきたため、 科学的理解は不十分であった.ところが、カロリー制限 に代表されるように食餌制限が老化・寿命制御の一要因 として見出され、それらが関わるシグナル伝達経路が同 定され、老化・寿命におけるカロリー制限の効果は世界 中で最も解析・理解が進んでいる.我々は、新規寿命延 長メカニズムを明らかにするため、酵母を使って野生型 株よりも顕著に寿命が延長した変異株の取得に成功した (変異を*SSG1*と命名).*SSG1*変異株はメチオニン代謝 産物である*S-*アデノシルメチオニン(SAM)を高蓄積 することが分かった.野生型株ではSAMの蓄積は殆ど 観察されないことから、*SSG1*変異株を用いて、SAMの 生理機能を明らかにすることを目的とした.

方法:SAMの細胞における生理機能を調べるため, SAM高蓄積株であるSSG1変異株を用いて、マイクロ アレイ解析およびメタボローム解析を行った.次に, Ssg1タンパク質自身の機能を明らかにするため、GFP を付加させた株を構築し、Ssg1の細胞内局在などの観 察を行った.

結果・考察:まず、マイクロアレイの解析から、野生型 株よりも*SSG1*変異株で2倍以上増加した転写産物とし て、メチオニン代謝系の遺伝子群以外にグルコース代謝 に関与する遺伝子が多数含まれていた.しかも、グルコー ス代謝に関わる遺伝子群はカロリー制限で高発現すると 報告されていた遺伝子との重複が認められた.このこと から、*SSG1*変異株ではカロリー制限模倣株になってい ることが示唆された.さらに、メタボローム解析を行っ たところ、*SSG1*変異株では SAM および *S*-アデノシル ホモシステイン (SAH)の増加が認められた.一方、ATP およびメチオニンの減少が観察され、これらは *SSG1*変 異株でSAM 高蓄積が観察されたことと一致した.

Ssg1 タンパク質は、薬剤排出トランスポーター MATE ファミリーと相同性を有したことから、Ssg1 は SAM 濃度調節に関わることが予想された.まず、Ssg1 の細胞内局在を調べた結果、Ssg1 は液胞膜に局在した. 興味深いことに、その局在は対数増殖期初期では液胞膜 に局在したが、その後定常期以降になるとその局在が消 失した.さらに、同時に Ssg1 タンパク質量もウエスタ ン解析により調べたが、対数増殖期初期では多く観察さ れたが、その後減少していった.現在、Ssg1 は SAM/ SAH の生合成や液胞輸送に関与するタンパク質と予想 し、SAM/SAH トランスポーターとして機能を有するの か検討している.

細菌の休眠および覚醒の制御機構の解明

山口良弘

大阪市立大学複合先端研究機構 yamaguchi@ocarina.osaka-cu.ac.jp

目的:細菌集団には増殖をしない休眠状態の細菌が存在 し、定常期やバイオフィルム内のおよそ1%を占めると 考えられている.休眠状態の細菌は薬剤などの様々なス トレスに強い耐性を示すため. 食中毒や感染症などの原 因となっている.しかし、その出現頻度の低さから休眠 および増殖再開機構の研究は停滞している。近年、細菌 は自身の生育を抑制する toxin およびその毒性を中和す る antitoxin の二つのタンパク質から構成される toxin-antitoxin (TA) system を有し、このTA system が休眠誘導 に関与していることが示唆されてきた.既に、大腸菌で は HipA-HipB TA system が休眠誘導に重要であると報告 された.しかし、hipA 欠損株は野生株と同等の休眠能 を示すことから、休眠へおよび休眠からの増殖再開には hipBA以外の因子の関与が示唆されている.我々は, HipA toxin と相同性を持つ YjjJ を同定し、さらに YjjJ は DNA および RNA 合成を阻害し, YjjJ-HipB TA system を構成することを報告した. HipB-HipA に加えて YijJ が休眠に関与すると推測されたことから、YjjJ toxinの 標的, さらにはHipB, YjjJ およびHipA間の相互作用 を明らかにし, YjjJ, HipAによる休眠および増殖再開 機構を解明することを目的とした.

方法: Escherichia coli MG1655 ΔyjjJ, hipA および hipB の multiple deletion mutant を作成し実験に用いた. 精製 His-PrS-tagged YjjJ, His-tagged HipA および His-tagged HipB は Ni-agarose カラムを用いて調製した. DNA 結合 実験は 0.8% アガロースゲルまたはアクリルアミドゲル を 用 い た EMSAで 解 析 し, YjjJ の DNA 結合 配 列 は SELEX 法およびゲルシフト法を用いて探索した.

結果・考察:YijJがDNAに結合したことから、YijJは DNA結合タンパク質であることが示された.また. DNA 結合能を欠失した YjjJ 変異体は生育を阻害しな かった.よって、DNA結合がYjjJによる生育阻害に重 要であることが明らかとなった. そこで、YiiJのDNA 結合配列を探索し, 25bp および 26bp のコンセンサス配 列を得た.興味深いことに、25bpのコンセンサス配列 にはCRISPRのリピート配列の一部が含まれていた.ま た, YjjJ はこれらの配列を含む dsDNA, dsRNA および ssRNAと結合することを明らかにした.次に、欠損株 を用いて YiiJ の生理的役割を解析した. その結果, yiiI および hipA の二重欠損はアンピシリンに対する感受性 を 6.2 倍増加させたが, yjjJ および hipA 遺伝子の単独欠 損は薬剤耐性に影響しなかった.よって、休眠を介した 薬剤耐性には, yjjJおよび hipA 両遺伝子が重要であるこ とが示された.現在, HipB, HipAおよびYijJの3者によっ てどのように休眠が制御されているか解析中である.

腸内細菌によるビフィズス菌の Fim 線毛の ポリマー化誘導因子の探索とその機構解明

西山啓太

北里大学薬学部, 現慶應義塾大学医学部 keita.nishiyama@keio.jp

目的:膨大な数の細菌が生息する腸内において、細菌は

互いに共生関係を保ちながら細菌叢を形成している. ビ フィズス菌はヒトに優勢な腸内細菌の一種であり、腸内 環境の恒常性維持と密接に関連することから重要な研究 対象である.しかし、ビフィズス菌が腸内でどのように 定着するのか、その分子機構は十分に明らかにされてい ない. 我々は. ヒトの便から分離されたビフィズス菌に Fim 線毛をコードする遺伝子が広く保存されている点に 着目した.興味深いことに、ビフィズス菌の線毛は、糞便 培養液中で培養した際にのみ、菌体表層に線毛ポリマー 構造を形成した. すなわち. ある種の腸内細菌に由来す る代謝産物が、ビフィズス菌の線毛を誘導したとの仮説 を立て、線毛誘導因子の探索と機構解明を目的とした. 方法:糞便培養液を遠心分離後フィルター濾過し、活性 カラム及び HPLC により分画・精製した.得られた各画 分を GAM 培地に添加し, Bifidobacterium longum と共 に培養した、線毛の誘導活性は、ウエスタンブロッティ ングおよび電子顕微鏡により評価した。標的物質の構造 決定は、質量分析および NMR 解析により行なった. さ らに、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析と、 Caco-2やHT29-MTX 培養細胞に対する接着試験を実施 した.

結果・考察:糞便培養液から線毛の誘導活性をもつピー クを分取し、構造解析を行った結果、芳香族アミノ酸の 一種(物質A)を同定することに成功した.物質Aを GAM 培地に添加し B. longum を培養したところ, 容量 依存的な線毛のポリマー化を確認することができた. 以 上より,物質Aは, B. longum の線毛誘導物質であると 結論づけた. また、物質A存在下において、B. longum の線毛関連遺伝子 (fimA, fimB, srtC) の発現は顕著 に上方制御されたことから、物質Aは、転写レベルで 線毛のポリマー化を誘導したことが確認された。さら に、ヒト腸上皮細胞に対する接着性は、物質A存在下 で顕著に増加した.すなわち、線毛のポリマー化は、 B. longumの接着を促進する重要なプロセスであると考 えられた.以上より、概ね実験計画を達成することがで きた.現在,物質Aの代謝酵素を標的として,物質A 産生菌を複数見出している. ビフィズス菌がこれらの腸

IFO Res.Commun. 33 2019

内細菌と物質Aを介して相互作用し,腸内での生存を 有利にするという,新たな共生関係の証明について取り 組んでいる.

アルキルアルコールを配糖化する 微生物由来の新規配糖化酵素反応の開発

上田 动 小山工業高等専門学校物質工学科 mueda@ovama-ct.ac.ip

目的:配糖化は化合物の安定性向上や物性改善に有用で あり,配糖体が有用な生理機能を持つ場合もある.微生 物酵素の糖転移反応は実用的で,ハイドロキノンやビタ ミンC配糖体合成などに実用化されている.我々は土 壌細菌のα-グルコシダーゼに着目し,アルキルアルコー ル配糖化酵素の探索と配糖体の合成検討を行い,生姜活 性成分6-ジンゲロールの配糖化を報告してきた.本研 究は芳香性や生理機能を持つテルペンアルコールを基質 とし,1級アルコールのネロールの配糖化検討および3 級アルコールのリナロールの配糖化等について検討し, 有用配糖体合成基盤の確立と酵素の性質解明を進めるこ とを目的とする.

方法:ネロールの配糖化は土壌分離細菌 Agrobacterium sp. M-12株の洗浄菌体を用い,マルトースをドナーとす る糖転移反応により行った.培養は1L-ジャーファーメ ンターで行い活性菌体を得た.配糖化反応は温度,pH などの至適条件を決定後,コニカルチューブ中(反応液 15mL)で行った.形質転換体の作製は,ゲノム公開株 で配糖化活性を有する Ensifer adhaerens NBRC100388^T からα-グルコシダーゼ遺伝子(GH family 13)のクロー ニングを行い,対象遺伝子をpET-19bベクターに組み込 み,大腸菌(BL21(DE3))に導入した.得られた形質 転換体を超音波破砕し,イオン交換とゲルろ過により酵 素精製を行った.酵素活性の測定はTLCとHPLCを用 い,生成物の同定はNMRにより行った.

結果・考察: Agrobacterium sp. M-12株の洗浄菌体によ るネロール配糖体の合成は、40℃, pH 7.0, マルトース

濃度100g/Lが至適であった. また, マルトースを主炭 素源とする培地でのジャー培養では培養25時間目の菌 体で最大活性が得られた.この洗浄菌体を用いてネロー ル1g/Lを含む反応液中(20mMリン酸緩衝液, pH 7.0) でネロール配糖体の合成を行った.40℃で72時間反応 を行った結果. 1.8g/Lの配糖体が蓄積した. モル収率 は 87.6% であった. E. adhaerens NBRC100388^T の α -グ ルコシダーゼ遺伝子を導入した形質転換体は所望の配糖 化活性を示した.精製した酵素の至適pHは7.5付近で あり、マルトース以外にスクロースやトレハロース、マ ルツロースを加水分解した. 配糖化活性の基質特異性を 確認した結果.3級アルコールのリナロールでの配糖体 合成を確認した. α-およびβ-グルコシダーゼによる配 糖化は3級アルコールでは困難であり、CGTaseでは tert-ブタノールでの配糖化例が報告されるのみであった が、本酵素はビールの芳香主成分であり生理機能の報告 もあるリナロールに対する配糖化が可能であることが明 らかとなった. 今後は、さらに多様な酵素を取得し、ア クセプターの水酸基の立体選択性や位置選択性等につい て検討を進める予定である.

「バイオ還元システム」利用拡大のための 補酵素再生系グルコース脱水素酵素の 進化工学的改変

片岡道彦

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp

目的:グルコース脱水素酵素(GDH)を様々なNAD(P)H 依存性の酸化還元酵素と組み合わせることにより,効率 的な還元システムが構築されており,多くの化合物の実 生産プロセスへの応用が期待されている.一方,種々の 酸化還元酵素が存在し,その基質/生成物の物性も含め て最適反応条件は様々であるため,還元システムの汎用 性を高めるためには幅広い条件下で高い活性を示す GDHの創出が必要となる. Bacillus megaterium 由来 GDHは反応性に優れた酵素であるが,酸性領域におい て酵素活性が著しく低下することが確認されている. そ こで、本研究では、GDHの物質生産における補酵素再 生系としての汎用性の向上を目的とし、酸性条件におけ る反応性をはじめとする諸性質が改善された GDHの創 出を試みた.

方法:ランダム変異導入により,野生型GDHより酸性 領域における活性が高いK179変異GDHが見出されこ とから,K179飽和変異体を作製し酸性条件下での酵素 活性を検討した.さらに,K179飽和変異体の中で温度 安定性の上昇が見られたK179R変異体についてpH依存 性,pH安定性,温度依存性,熱安定性についても検討 した.また,GDHの安定性向上へのアプローチの一例 として,四量体を構成するサブユニット同士の相互作用 の強化が挙げられる.そこで,255番目のセリン残基を システインに置換することによる*B. megaterium*由来 GDHへの影響を検討した.

結果・考察: K179 飽和変異体の pH 5.0 における活性を 測定した結果,野生型と比較して有意に活性が上昇する ような変異体は見られなかった.次に,0℃及び37℃で の静置における残存活性測定を行った結果,K179R 変異 体について,0℃,37℃静置共に著しい比活性の上昇が 見られた.K179R 変異体について詳細に検討した結果, 熱安定性については0~40℃の範囲で残存活性の上昇 が見られたが,他の性質については野生型と同程度であ ることが明らかとなった.

一方, S255C 変異 GDH について, 野生型 GDH と比 較すると全体的な pH 安定性の向上が確認された. しか し, 酸性領域においても pH 安定性の向上が見られたに もかかわらず, アルカリ領域と異なり酸性 pH 領域での 活性上昇は見られなかった. 次に, 熱安定性については 37℃以上の温度でその安定性の向上が確認された. 野 生型 GDH が 37℃で大きく残存活性が低下し 50℃で完 全に失活するのに対し, S255C 変異体は 37℃静置後も 0℃と同程度の活性を維持しており, 50℃静置後も約 79%の活性を維持していた. 温度依存性については, 60℃以下においては温度依存的に活性が増加すること が確認された.

大腸菌エネルギー代謝における解糖系と 好気 TCA 経路の使い分け・ 相互変換スイッチング機構の解明

田 中 寛

東京工業大学科学技術創成研究院 kntanaka@res.titech.ac.jp

目的:グルコースを含む培地で大腸菌を培養すると,グ ルコースは他の炭素源の利用を抑制して優先的に消費さ れるが,これは Inducer exclusion によるグルコース抑 制や cAMP を介した Catabolite repression により説明さ れてきた.ここで取り込まれたグルコースは解糖系によ りピルビン酸まで分解され,その大部分はアセチル CoA を経て酢酸として細胞外に捨てられる.これを酢酸オー バーフロー代謝と呼ぶ.本助成対象者は以前の研究で, この酢酸オーバーフロー代謝の欠損によりグルコース枯 渇後に一過的な数時間の増殖停止が起こることを見出し た.cAMPに関わる発現調節はここには関与しておらず, 新規制御系の存在が示唆されたことから,本研究ではそ の分子機構の研究を行なった.

方法:本研究では,限定量のグルコースと過剰量のアミノ酸を含む M9 最小培地でのバッチ培養系を用いた.こ こでは最初にグルコースが消費され,順次アミノ酸,一 旦排出された酢酸の順に炭素源の切り替えが起こる.大 腸菌の変異株としては KO ライン,遺伝子の過剰発現に はASKAラインを用いた.SWATH 法によるプロテオー ム解析は東工大・田口英樹教授,丹羽達也助教のご協力 により行なった.

結果・考察:グルコース枯渇前後のタイミングで大腸菌 野生型株,および酢酸オーバーフロー経路を欠くpta変 異株を回収し、中央代謝経路の酵素タンパク質群を対象 に定量的プロテオーム解析を行なった.その結果、ほと んどの酵素量に違いが見られなかった一方で、pta株で はAceA/AceBタンパク質量(グリオキシル酸経路酵素) の減少、AceE/AceFタンパク質量(ピルビン酸デヒド ロゲナーゼ:PDH)の増加が観察された.これらはそ れぞれIcIR、PdhRをレプレッサーとするオペロンに含 まれており、共通の調節因子であるピルビン酸濃度の上 昇を示唆する結果となっていた.さらに、pta 変異株の 中で PdhR を過剰発現させる実験を行なったところ、実 際にグルコース枯渇時の増殖停止が解消した.従って、 酢酸オーバーフロー代謝の欠損により細胞内にピルビン 酸が蓄積し、これにより PdhR の負の制御下にある PDH の発現が増加することで、グルコース枯渇時の増殖が阻 害されたことが示唆された.

これまでの研究で我々は、PDHと2-オキソグルタル 酸デヒドロゲナーゼ(OGDH)の活性が競合的に制御 される証拠を得てきた.その一方で、OGDHの欠損株 ではグルコース枯渇後の増殖が完全に阻害されることも 観察している.これらを考え合わせると、酢酸オーバー フロー代謝系の欠損によるPDH発現の上昇は、OGDH の活性化阻害を介してグルコース枯渇後の増殖を阻害し ていることが示唆される.その先で、OGDHがどのよ うにしてこの増殖を制御しているかについては、現在さ らなる解析が進行中である.

微生物由来ピペリン代謝酵素に関する研究

小林達彦

筑波大学大学院生命環境科学研究科 sec.mmb.tsukuba@gmail.com

目的:コショウは16世紀の大航海時代にインドから ヨーロッパにもたらされ,現在では香辛料として世界中 で用いられている.コショウの辛味成分はピペリンとい うアルカロイドである.長期にわたり世界中の人々に食 され,また,栽培されてきたにも関わらずピペリンがど のように代謝(分解)されるのかを酵素レベルで解明し た研究はない.そこで我々はピペリンを資化(分解)す る微生物を探索し,その代謝酵素を同定し機能を解明す ることを目的とした.

方法:ピペリンを単一窒素源とする合成培地で生育する 微生物(No.14株)から,硫酸アンモニウム沈殿および 各種カラムを用いたクロマトグラフィー操作によりピペ リン分解酵素の精製を行った.精製した酵素の諸性質の 解析および,酵素の異種発現を検討した.

結果・考察:当研究室ではピペリン資化微生物のスク リーニングにより、ピペリンをピペリン酸へと分解する No.14 株を単離していた.本研究ではまず、ピペリン酸 とともに生じるであろうもう一つの反応産物の同定を 行った.反応溶液にアミン修飾試薬である NBDF を作 用させ質量分析を行い、もう一つの反応産物はピペリジ ンであることを同定した.次に、ピペリンをピペリン酸 とピペリジンに代謝する酵素の精製を試みた. No.14株 のピペリン分解活性は培養上清に見られたため、培養上 清より SDS-PAGE 上で単一になるまでピペリン代謝酵 素の精製を行い、約35kDaの酵素を同定した、本酵素 のピペリンに対する Km は極めて低いことがわかり、菌 体外酵素である本酵素が環境中の低濃度のピペリンとも 十分反応できることが示唆された. また. 低分子化合物 の酵素活性への影響についてはシステイン修飾試薬や一 部のキレート剤が酵素活性を阻害することがわかった.

また、本酵素のN末端部分アミノ酸配列の情報をも とにNo.14株から本酵素遺伝子を同定した.大腸菌およ び放線菌を宿主として異種発現を試みたが本酵素の発現 および活性は菌体内、培養上清ともに検出されなかった.

本研究で同定したピペリン代謝の初発反応を担う酵素 はピペリンの3級アミド結合を加水分解する酵素であっ た.3級アミド結合は窒素原子に水素が付加していない アミド結合であり、プロリンのアミノ末端がペプチド結 合を形成する場合にも見られる.プロリンのアミノ末端 に見られる3級アミド結合はXaa-Proアミノペプチダー ゼにより加水分解されることが報告されているが、今回 我々が発見した酵素はXaa-Proアミノペプチダーゼとは アミノ酸配列の相同性がない酵素であった.天然低分子 化合物の3級アミド結合を分解する酵素はこれまでに報 告がなく、天然においてピペリンがどのように代謝され ているのかは不明であったが、本研究により初めて解明 することができた.

PET 分解酵素の structure-based design による高機能化と応用に関する研究

織田昌幸

京都府立大学大学院生命環境科学研究科 oda@kpu.ac.jp

目的:本研究対象の polyethylene terephthalate(PET) 分解酵素 Saccharomonospora viridis AHK190 由来クチ ナーゼ(Cut190)について、本研究開始前に解明して いた基質複合体以外の基本的な結晶構造情報を利用して structure-based design(SBD)により高機能化を行い、 PET 加工や廃 PET リサイクルへの応用を目指した.本 研究では、主に以下の各項目の解明を目的とした.Cut190 の高機能化変異体の1つS226P/R228S 変異体(Cut190*) について、基質との複合体の結晶構造を解明する.得ら れる構造情報に基づき、活性と安定性をさらに向上させ た変異体を創製し、その高機能化要因を解明するととも に、PETの分解活性を検証する.Cut190 が Ca²⁺により 活性化、安定化することに着目して、その要因を他の金 属イオンの影響評価結果も踏まえて解明する.

方法: Cut190 各種変異体を,大腸菌発現系を用いて調 製した. Cut190*の不活性型 S176A 変異体と各種基質ア ナログの複合体を結晶化し,X線構造解析を行った.得 られた立体構造情報に基づき,分子動力学(MD)計算 により基質結合に伴う構造変化を解析した. Cut190*S176Aの Ca²⁺添加に伴う安定化機構を解明すべ く,示差走査熱量計(DSC)による解析を行うとともに, Ca²⁺以外の二価金属イオン(Zn²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺)が Cut190*の活性化に及ぼす影響を評価し,等温滴定熱量 計(ITC)で得られる各金属イオンの結合熱力学量や, 円二色性分散(CD)測定で得られる熱安定性への影響 と比較,検討した.

結果・考察: Cut190*S176A と Ca²⁺ または Zn²⁺,及び monoethyl succinate または monoethyl adipate との各複 合体の結晶構造解析を行った.得られた情報から触媒反 応前後と考えられる立体構造を高分解能で決定し,MD 計算結果とあわせて,金属イオンにより制御される新規 の触媒反応機構を提唱した. さらに Cut190 各種変異体 を用いた研究を通じて, Cut190* 以上に高機能化した変 異体を取得するとともに,結晶構造で明らかにした複数 の Ca²⁺結合部位の個々の役割を解明した. また Ca²⁺結 合に伴う安定化の DSC 解析と MD 計算から,安定化が Cut190 蛋白質の運動性低下により,分子内結合が強く なったことに起因することを明らかにした. さらに Ca²⁺ 結合は,他の二価金属イオン結合よりも弱く,この弱い 結合が, Cut190 蛋白質の運動性を極端に低下させるこ となく,一定の柔らかさを維持し,この柔らかさが活性 発現に重要であることが示唆された.

藻類のミルキング培養法による省エネ型 バイオ燃料生産プロセスの開発

大田昌樹

東北大学大学院工学研究科 附属超臨界溶媒工学研究センター otam@tohoku.ac.jp

目的:本研究では、牛からの搾乳のように藻類細胞外産 生オイル(炭化水素)を搾油するミルキング培養法と呼 ばれる方法論より連続式湿式抽出法を開発した. Botryococcus braunii は細胞外にボトリオコッセンなどを 分泌生産する緑藻であり、生産されたオイルはコロニー 内に主に蓄積される.顕微鏡観察の際にスライドガラス を押して圧力をかけるとオイルが外部に浸出する様子を 観察できる.このように何らかの外力を加えてオイルを 浸出しやすくさせることで、細胞を生存させた状態でオ イルのみを簡便に抽出できる可能性があり、これを実証 することを目的とした.

方法:実験は、筑波大学より分譲された*B. braunii* BOT-22株(オイル含有率 0.189g/g-dry algae、藻体平 均径 13.5 μ m)を試料として用いた. コロニー径が一般 に 50 μ m 程度であることを考慮し、さらにコロニーに対 して高い剪断力を与えつつライン閉塞がない条件とし て、内径 175 μ m、長さ 3 cm のキャピラリーチューブに 培養液を 5~120 cm³/min で流通させた際の剪断応力を 利用してコロニーを解砕した. なお, コロニー解砕の評価はコロニー解砕前後の藻体の円相当径を測定する他, 細胞毒性が低いとされる *n*-heptane を培養液に対して体積基準で5倍量添加し, 20min, 300 rpm にて回分抽出した後に GC-FID 分析によりオイルを定量して行った. その際,オイル成分は BOT-22 株の代表的な産生物である炭化水素 C₃₄H₅₈とし,オイル回収率を用いてコロニー 外に滲出したオイルの抽出を評価した. なお, 定量分析には GC-FID を用いた.

結果・考察:高 Reynolds (Re) 数領域ではオイル回収率 が著しく向上する一方で,平均円相当径は減少した.こ れは藻体に作用する剪断応力によりコロニーが解砕され ることでコロニーに内包されていたオイルが滲出された ためと考える. 実際, 120 cm³/min 時に低粒径への明確 な遷移が確認された.以上より、本法の連続式コロニー 解砕法としての有用性が示唆された。本プロセスの将来 的なスケールアップに向けて、オイル回収率の Re 数依 存性の一般化を試みた. 流量などの実験条件を変化させ、 各 Re 数に対してオイル回収率をプロットすると、オイ ル回収率はRe数に対しておよそシグモイド型の曲線で 表現できることがわかった.以上より.オイル抽出挙動 が本モデルにより予測できる可能性が示唆された. その 一方で、有機溶剤を用いた接触抽出工程においては、フ ラッフ層(中間層)を生じない流量比の調整が必要であ ることがわかった. これより, B. braunii 炭化水素の連 続式湿式抽出の可能性が示唆された.

1,3-ジオール骨格化合物の発酵生産に 向けたプラットフォーム経路の構築: 再生可能資源からのロケットプロペラント 前駆体生産への挑戦

片岡尚也

山口大学大学院創成科学研究科 nkataoka@yamaguchi-u.ac.jp

目的:近年,低炭素社会実現のため,化石資源から産出 される化成品を発酵により生産するバイオリファイナ リー研究が世界中で推進されている.こういった背景の もと我々は以前,産業的に利用価値の高い"非天然化合物"1,3-ブタンジオールを生成しうる合成代謝経路の設 計・大腸菌内での構築を報告した.本研究では,構築し た1,3-ブタンジオール合成代謝経路を拡張することで 様々な1,3-ジオール骨格化合物の発酵生産に活用できる プラットフォーム経路を開発するとともに,その経路を 応用し,ロケットプロペラント前駆体として有望な 1,2,4-ブタントリオールを再生可能資源から発酵生産す ることを目的とした.

方法:大腸菌 BW25113 F'を生産宿主として用いた.生 産培地は、グルコース含む改変 M9 培地を用いた.生産 は対数増殖期中期に IPTG を添加することにより開始し た.各有機酸は IPTG 添加時に加えた.培養は30℃で行っ た.代謝産物及び出発基質濃度は HPLC により定量した. 菌体増殖は 600 nm の吸光度を測定することにより確認 した.

結果・考察:我々が以前に大腸菌内で構築した1.3-ブタ ンジオール合成代謝経路は, Ralstonia eutropha 由来 PhaAB, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 由来 Bld 及び内在性アルコール脱水素酵素で構成されていた。本 経路を基盤に、PhaAを幅広いアシル CoAへの活性を有 する R. eutropha 由来 BktB へ変換し、有機酸の CoA 誘 導体化を触媒する Megasphaera elsdenii 由来 Pct を付加 する二つの改変を施すことで、目的の1,3-ジオール類プ ラットフォーム経路を設計した. bktB, phaB, bld, pct を IPTG 誘導型プロモーター支配下に配置した発現用プ ラスミドを構築し、大腸菌に導入した、まず初めに、 Pctの本来の基質であるプロピオン酸とグルコースから 生成される1.3-ペンタンジオールの生産を試みた. 組換 え大腸菌をグルコースとプロピオン酸を基質とした培地 で好気的に培養した.両基質は同時に消費され、48時 間の培養で完全に枯渇した.一方で、生成物として 1.3-ペンタンジオールが確認された. これは、設計した 1.3-ジオール類プラットフォーム経路が大腸菌内で機能 的に構築されたことを示している.次に、本プラット フォーム経路の汎用性を実証するべく、プロピオン酸の

代わりにイソ酪酸又はグリコール酸を用いて,同様の方 法で生産試験を行った.その結果,イソ酪酸を用いた場 合に4-メチル-1,3-ペンタンジオール,グリコール酸を 用いた場合に1,2,4-ブタントリオールの生成を確認し た.以上の結果は,構築した合成代謝経路が様々な化学 骨格を有する1,3-ジオール類の発酵生産のためのプラッ トフォーム経路として活用できることを明確に示してい た.今後,再生可能資源からグリコール酸を効率的に生 成する経路を加えて付与することで,本研究の目的が達 成できると期待される.

電気化学的制御によるセルロース ナノファイバーの高効率合成

椎 木 弘

大阪府立大学工学研究科 shii@chem.osakafu-u.ac.jp

目的:バイオリファイナリの観点から. セルロースナノ ファイバーを用いた新しい材料の開発が注目されてい る。セルロースナノファイバーは、植物や微生物などの バイオマスから取得され、軽量でありながら高い機械強 度や耐熱性など優れた特性を有する.しかしながら.植 物由来のナノファイバーは加工性に乏しく,成形の際, 機械的粉砕による微細化を要するため。 本来の優れた特 性とのトレードオフとなる.一方,酢酸菌(Acetobacter xvlinum)はグルコースを摂取して酵素複合体からセル ロースを排出し、ボトムアップ的にナノファイバー構造 体を形成する.したがって、培地形状に則した構造体の 取得が可能であり、ナノファイバーの特性を損なうこと なく活用できる点で優位である.本研究では、酢酸菌の 代謝系を電気化学的に解釈し、電位制御によるセルロー スナノファイバーの高効率合成を目的とした. また, 金 属ナノ構造体との複合化について検討し、新しいセル ロースナノファイバーの応用の探索も目的とした.

方法:酢酸菌を含む液体培地(pH 6.5)をH型電解セ ルのアノード室に,リン酸緩衝生理食塩水をカソード室 に充填した.グラッシーカーボン電極を作用極,白金メッ

シュ電極を対極、銀/塩化銀電極を参照極として電圧印 加した、その際、アノード室には酸素ガスを導入し、 30℃の恒温槽内で12時間培養を行った。培養後、アノー ド室から液体培地の一部を取り出し、菌数計測した. 結果・考察:好気性細菌は酸素を電子受容体として電子 を体外へ放出する、したがって、アノード反応により、 細菌の代謝が促進されることが予測される。酢酸菌はエ タノールを消費して電子を生成し、酸素を水に還元する. そこで、H型電解セルのアノード室に酢酸菌を添加し、 電気培養を行った。+400mV印加して24時間培養した ところ、通常培養(電圧印加無)の60倍以上の増殖が 見られたが. Bacillus cereus によるコンタミネーション が認められた. Bacillus 属の細菌は低 pH での生育が困 難であることから、液体培地のpHを4.3に調整し、再 度電気培養を行った. その結果、コンタミネーションは 見られず。12時間培養では培養前の2.5倍。24時間培 養では 8.0 倍の増殖が見られた。

一方、

通常培養では、

1.1 ~1.3 倍の増殖にとどまった.このように、電圧印加の 有効性が見られたことから、印加電圧について検討を 行った. +800mV印加したところ. 12時間後には培養 前の3.5倍に増殖した。一方。-400mV印加した場合。 通常培養と同程度であった. これらのことから、アノー ド反応により、酢酸菌の増殖が促進されることが分かっ た.本研究により、酢酸菌によるセルロースナノファイ バー合成の効率化が期待される.

サンゴ共生藻における宿主非依存的な 光合成産物の分泌に関わる 環境応答シグナル経路

丸 山 真一朗

東北大学大学院生命科学研究科 maruyama@tohoku.ac.jp

目的:褐虫藻は,Symbiodiniaceae 科に属する単細胞渦 鞭毛藻で,造礁サンゴ等の刺胞動物に細胞内共生し,特 に貧栄養の熱帯海洋環境において生物多様性を支える重 要な生態的ニッチを占める.こうした共生成立機構を解 明するためには,褐虫藻が刺胞動物細胞内に共生してい る時としていない時での生理的変化,共生の不安定化と 崩壊(「白化」現象とも呼ばれる)を引き起こす環境ス トレスに対する微細藻類側の環境応答などを理解する必 要があるが,未解明な点が多く残されている.本研究で は,褐虫藻を擬似的に共生状態を模した条件で培養し, それに応答して起こる生理的・代謝的・遺伝子発現的変 化を通して,共生において微細藻類が果たす役割を分析 することを目的とした.

方法:褐虫藻の代表的な無菌培養株*Breviolum* sp. SSB01 株を,宿主刺胞動物の細胞内の食胞環境を模した酸性条 件で培養し,宿主動物が共在しない単独培養の「共生ミ ミック」褐虫藻を生育させる系を構築し,微小酸素発生量 測定法を用いた光合成活性解析やIllumina NovaSeq6000 シーケンサを用いた RNAseq 法による遺伝子発現変動解 析などを行った.

結果・考察:過去の研究で、酸性条件(pH 5.5)で単独 培養した場合にグルコース分泌の亢進が検出されたこと から、これを元に、環境の酸性化に応答した糖分泌シグ ナル経路を解析するため、褐虫藻を単独培養し、通常条 件と酸性条件の IMK 培地にてそれぞれ培養した後、グ ルコース分泌に差が見られた24時間後に藻体を回収し、 RNAseq による遺伝子発現解析を行なった.通常培地へ の置換では少数の遺伝子が発現変動するに留まったのに 対し,酸性培地に交換した場合には200遺伝子ほどにお いて有意な発現レベルの変動が見られ、これらの遺伝子 群を Gene Ontology 解析により機能的比較分類を行なっ たところ、光合成やリボソーム(翻訳機能)に関わる遺 伝子群が顕著に発現変動していることが分かった.また. 細胞外からの炭酸イオンの取り込みに関わるトランス ポーターや、葉緑体膜に局在し、葉緑体内から細胞質へ の糖(三炭糖または六炭糖)の輸送に関わるトランスポー ターなどが発現量変動を示していた.一方、微小酸素発 生量測定を基にした光合成活性の計測を行ったところ. 酸性条件では活性が有意に減少することが示された、こ れまでグルコース分泌は、共生体が宿主とのコミュニ ケーションの一環、あるいはは栄養分供給として能動的 に行っていると一般的には考えられていたが、本研究に より、一種の酸性ストレス環境下で生理機能が低下する のを補う補償機構として働く可能性が示された.今後は、 pHと糖輸送活性との関係を生化学的に検証することに より、宿主動物とは独立した、シンプルな微細藻類の環 境応答としての糖代謝制御機構が明らかになると期待さ れる.

嫌気環境での高効率キシロース発酵に向けた Spathaspora 属酵母のキシロース代謝 遺伝子群の機能解析

笹野 佑

大阪大学大学院工学研究科, 現 崇城大学生物生命学部 sasano@bio.sojo-u.ac.jp

目的:食料と競合しないバイオマス原料として草本木質 系原料からのバイオエタノール生産が望まれている.こ のためキシロースの効率的な発酵が重要である.しかし. 従来知られているキシロース発酵性酵母は、キシロース を代謝するために酸素が必要であるという特徴があり、 発酵液中の酸素濃度を厳密に制御する必要から培養制御 の困難さ及び設備コスト増につながるという問題があっ た. 近年単離された子嚢菌酵母 Spathaspora passalidarum は、嫌気条件においてもキシロースを効率的に 発酵することが出来るという大きな特徴がある、本酵母 は真菌類にみられるキシロース代謝経路の酵素遺伝子の パラログが2コピーずつ (XYL1.1, XYL1.2, XYL2.1, XYL2.2) ゲノム上に存在するユニークな特徴があるが. それぞれの遺伝子の役割は分かっていない. そこで、本 酵母が嫌気条件においても効率的に発酵出来るメカニズ ムを、キシロース代謝経路の重複遺伝子の機能に着目し て解明することを目的とした.

方法:2%グルコースまたは2%キシロースを単一の炭 素源として含む培地において,通気条件を好気と嫌気の 両条件でXYL遺伝子の転写量を解析した.転写量の解 析方法は各培地において培養した菌体を回収,RNAを 抽出した後,各*XYL*遺伝子の転写量をリアルタイム PCRにより測定した.また,*XYL*遺伝子の破壊株の作 製は著者らが以前に確立した,エレクトロポレーション 法による方法を用いた.

結果・考察:炭素源がグルコースの培地においてはどの XYL遺伝子も転写が誘導されなかったのに対して、キ シロースの培地ではどの遺伝子も転写が増加した.特に、 グルコース培地条件と比較してXYL1.1は好気条件で約 27倍、XYL1.2は嫌気条件で約65倍転写量が増加した. このことから、好気条件では主にXYL1.1、嫌気条件で は主にXYL1.2を発現することで、どちらの環境におい ても迅速なキシロース資化が可能になっていると考えら れた.

さらに、4つのXYL遺伝子の単一破壊株を構築した. 作製した破壊株をグルコースまたはキシロース培地で好 気と嫌気の両条件において生育を測定した.その結果、 好気的条件下においても嫌気的条件下においても XYL1.2とXYL2.1遺伝子破壊株の生育は野生型株より も弱いことが分かった.また、本酵母のXYL遺伝子を 様々な組み合わせで出芽酵母に発現させたところ、 XYL1.2とXYL2.1遺伝子を導入した株が嫌気条件での キシロースからのエタノール発酵の能力が最も高かっ た.以上の結果より、4つのXYL遺伝子の中でも、少 なくとも嫌気条件においては、XYL1.2とXYL2.1が主 要な働きをしている遺伝子であると考えられた.本研究 の成果は、嫌気条件での効率的なキシロース発酵技術の 開発に繋がるものと期待される.

嫌気的環境汚染物質分解菌の 遺伝子導入・破壊系の開発

野尻秀昭

東京大学生物生産工学研究センター anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

目的:一部の嫌気性細菌は地下水や土壌などの汚染浄化 において重要な役割を果たすが,遺伝子工学ツールの開 発や遺伝子機能解析が遅れているため,研究開発の試み が頓挫することも少なくない.特に遺伝子組換え体の取 得には,遺伝子導入操作の後,導入効率が不明のまま数 週間培養を行うため非常に時間がかかる.本研究ではこ の問題を解決するため,酸素を必要としない蛍光タンパ ク質をマーカーとし,フローサイトメーター (FCM) により遺伝子導入に成功した細胞を検出・分画するシス テムの開発を目的とした.

方法:通性嫌気性細菌である大腸菌と, 偏性嫌気性細菌 である *Geobacter sulfurreducens* PCA 株をモデルとして実 験を行った.マーカーには flavin mononucleotide-based fluorescent proteins の一種である Evoglow (evocatal) を使用した. FCM には MoFlo XDP (Beckman Coulter) を使用したが, FCM での分取中に細胞が酸素に曝露さ れるのを極力抑えるため, FCM 全体を覆うことのでき るビニールチャンバーを作製し, 内部を窒素ガスで置換 して使用した.

結果・考察:本研究で作製したビニールチャンバーを使 用したところ, FCM 使用時にチャンバー内の酸素濃度 を5%程度まで下げることができた。この条件で G. sulfurreducens PCA 株の細胞画分を分取し、培養後に 生育したコロニー数から生残数を算出したところ. 好気 条件下で分取した場合と比べて2~5倍程度の改善が見 られた.この結果から、本研究で整備した装置は偏性嫌 気性細菌の細胞分取に適していると考えられた.次に、3種 を大腸菌とG. sulfurreducens PCA株内で発現させ, FCM で蛍光強度を測定した.大腸菌において lac プロ モーター下で発現させたところ, Evoglow-Pp1のみで細 胞分取の指標として用いることができる程度の蛍光強度 が確認された. SDS-PAGEの結果からは, Evoglow-Pp1 の発現量が他に比べて多いことが確認された。一方. G. sulfurreducens PCA 株では Evoglow の 蛍光を検出する ことができなかった.大腸菌の結果と併せて考えると、 細胞内の発現量が不十分であったと推察される.

今後,本システムを様々な嫌気性細菌に適用するため には,FCM分取時のチャンバー内の酸素濃度をさらに 下げること,対象とする細菌種に適したプロモーターと 組み合わせた遺伝子カセットを作製し, Evoglowの発現 量を十分確保することが重要であると考えられる.特に チャンバー内の酸素濃度については,FCM用のシース 液を脱気した後に数週間嫌気条件下で静置するなど,方 法論を確立していく必要がある.将来的には,未だ遺伝 子組換え手法が確立されていない嫌気性細菌にも上述の 実験系を適用し,遺伝子組換え体の効率的な取得が可能 になるか評価を行うことで,嫌気的環境汚染物質分解菌 の遺伝子機能解析を加速することが可能になると期待さ れる.



目的:高負荷・高速運転が可能な Expanded granular sludge bed (EGSB) リアクターの普及や適用廃水種の 拡大に伴い,未だ認知されてない問題が確認されてきて いる.とくに深刻な問題は,糸状性微生物の異常増殖に よるグラニュール汚泥が突発的に浮上・流出する嫌気性 バルキングである.ひとたび,嫌気性バルキングが発生 すると,リアクターを停止せざるえない事態になる.し かしながら,その発生メカニズムはおろか原因菌すら不 明であり,即効性の高い対策が立てられずにいる.先行 研究では,EGSBリアクター外に流出したフロック状汚 泥の大部分を構成する糸状性微生物が,嫌気性バルキン グに関与することを明らかにした.嫌気性バルキングの 発生メカニズムを推定するため,本研究では,バルキン グ原因菌を同定するとともに,微生物機能情報を明らか にすることを目的とした.

方法:高濃度食品系有機性廃水を処理する実規模の中温 (37℃) EGSBリアクターより,採取時期の異なる嫌気 性バルキング汚泥(2種)と健全なグラニュール汚泥(2 種)をそれぞれ採取した.4種の汚泥よりDNAを抽出 した後、16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析を行った. その後、微生物群の存在比を基に、スピアマンの順位相 関係数を算出した.バルキング原因微生物の形態観察は、 16S rRNA に特異的な DNA プローブを用いた *in situ* DNA-hybridization chain reaction (HCR) 法によって行っ た. 健全なグラニュール汚泥切片におけるバルキング原 因菌の空間分布は、Fluorescence *in situ* hybridization 法 により評価した.バルキング原因菌の分離・培養は、希 釈培養法やロールチューブ法を用いて行った.

結果・考察:健全なグラニュール汚泥と比較して、1種 の嫌気性バルキング汚泥では、ユリアーキオータ門(2 種). クロロフレキシ門(2種)およびプロテオバクテ リア門(3種)に属する微生物種が統計的に有意に増加 したが、他方では、クロロフレキシ門(3種)のみであっ た. 嫌気性バルキング汚泥に対して in situ DNA-HCR法 を適用した結果.メタノサエタ属アーキア(ユリアーキ オータ門) とアナエロリネア綱細菌 (クロロフレキシ門) は糸状性であることがわかった.スピアマン順位相関係 数に基づき、バルキング原因菌の異常増殖の要因は、運 転条件や環境要因の同一の変化であることも示唆され た、バルキング原因菌の空間分布調査の結果、アナエロ リネア綱細菌は、糖のような発酵過程の比較的初期の有 機物を利用することが示唆された. さらに、バルキング 汚泥を植種源とした集積培養では、グルコースと酵母抽 出液を用いることで、当該アナエロリネア綱細菌を優占 させることにも成功した.

鉄還元菌の多環芳香族炭化水素 嫌気性分解代謝系の解明

井 上 謙 吾

宮崎大学農学部 kinoue@cc.miyazaki-u.ac.jp

目的:多環芳香族炭化水素は毒性,難分解性を持つ.こ れまでの多環芳香族炭化水素の微生物分解に関する研究 は主に好気的分解について進められており,嫌気的に分 解する微生物,嫌気性分解代謝経路に関する知見は極め IFO Res.Commun. 33 2019

て少ない. そこで,本研究では,鉄還元菌による嫌気的 な多環芳香族炭化水素分解代謝経路を明らかにすること を目的とした.

方法:代表的な多環芳香族炭化水素であるフェナントレ ンとピレン、それぞれが唯一の電子供与体、不溶性の酸 化鉄(III)が電子受容体となる嫌気的培地を用い. 自然界 から採取したサンプルを植種源として集積培養を行っ た、集積培養液からそれぞれの基質を含む寒天プレート (基質の不溶性によって白濁)を用いて単離を試みた. 基質の分解能力はコロニーの周りに基質の分解を示すク リアゾーンが形成されるかどうかで判定した.得られた 分解菌については、市販の培地や最少培地を用いて生育 可能な条件を探索した.液体培地での生育が観察できた 株については、ゲノム抽出後、16S rDNA 配列の決定に よる属種の同定を行った.分離した株の鉄還元能力は. 酸化鉄(III)を含む培地で培養後、フェロジン法を用いて 経時的に生成 Fe²⁺濃度を測定することで評価した.また. 単離株が利用できる電子受容体などについても検討を 行った.

結果・考察:集積培養とそれに続く単離操作により、2 株のフェナントレン分解菌と4株のピレン分解菌の取得 に成功した.フェナントレン分解菌のうち1株(YPH02 株と命名)は Clostridium 属, ピレン分解菌 (YPY02株, YPY03株, YPY04株, YPY05株と命名)はClostridium 属,あるいは Sporomusa 属に分類される細菌であった. フェナントレン分解菌 YPH02 株は市販の栄養培地で旺 盛に生育することができ、その生育速度も早く、嫌気条 件下、約24時間でプラトーに達した、酸化鉄(III)の環 元能力を調べたところ、フェナントレンを電子供与体、 酸化鉄(III)を電子受容体として、酸化鉄の還元を示す Fe²⁺が生成されたことから、YPH02株は鉄還元能力を持 つフェナントレン分解菌であることが確認できた. YPH02株はフェナントレン以外にも、ベンゼン、乳酸 を電子供与体とする培地で生育したが、トルエン、酢酸 を電子供与体とする培地での生育は芳しくなかった.

ピレン分解菌4株のうち、3株のみ5倍希釈した変法 GAM 培地で嫌気的条件で生育が確認できた. 生育可能 な pH を検討したところ, YPY02 株, YPY03 株, YPY04 株ではアルカリ性の培地 (pH 11) でも生育が可能であっ たことから,これらの株が耐アルカリ性菌でもあること が示唆された.これらのピレン分解菌のうち, YPY02 株と YPY04 株は酸化鉄(III) だけでなくフマル酸も電子 受容体として生育可能であることが明らかになった.

陸生カニ消化管より得られた 微生物コンソーシアのセルロース・ リグニン分解機序の解明と メタン発酵前処理への応用

馬場保徳

石川県立大学生物資源工学研究所 ybaba@ishikawa-pu.ac.jp

目的:セルロースおよびリグニンは,地球上に最も多く 存在する天然高分子であり,難分解性である.とくに, 嫌気下では分解され難く,これらを含む紙類や野菜残さ の可溶化が、メタン発酵の課題として残されており、リ グノセルロースを分解する前処理法の開発が求められて いる.そこで私たちは,落ち葉・木片を食べるアカテガ ニの消化管には、セルロースやリグニンを分解する微生 物が存在することを期待し、紙入りの液体培地を使用し た集積培養を試みたところ、紙を解繊する微生物群集を 得た.本研究では、メタン発酵前処理への応用を目ざし て、アカテガニ消化管微生物群集がどのような機序で紙 を解繊するのか明らかにすることを目的とした.

方法:微生物群集構造解析は、カニの消化管内容物から DNAを抽出し、16S rDNA および ITS 領域を増幅した後、 次世代シーケンサー MiSeq に供した.得られた配列情 報は QIIME software により解析した.RNA-seq はカニ の消化管から RNAを抽出し、北海道システムサイエン スに外注した.セルロースおよびリグニン分解微生物の 分離は、好気もしくは嫌気条件下にて、CMC-congo red およびリグニン試薬を寒天培地に添加し、これらに ハロが形成されることを指標に実施した.

結果・考察:得られた集積培養物は植え継ぎとともに紙

の分解能を失った. 培養条件検討の一助とするため, 接 種源であるカニ消化管内容物の微生物群集構造解析を実 施するとともに、宿主(カニ)由来酵素がリグノセルロー ス分解に寄与している可能性を考え、宿主のRNA-seq を実施した. その結果, Penicillium や Aspergillus などの リグニンおよびセルロース分解性好気性真菌と、セロビ オース. 単糖および芳香族化合物を利用する好気性細菌 が検出され、嫌気性微生物はほとんど検出されなかった. 一方, 宿主の RNA-seq の結果, 宿主自身もリグノセル ロース分解に関与することが示唆された.以上より、カ ニ消化管内では、宿主自身の酵素および好気性真菌によ りリグノセルロースの分解がおき、細菌はその分解物を 利用しているものと考えられた. また、菌叢解析の情報 に基づき、好気性真菌用の培地を用いることで、本研究 で検出された好気性リグノセルロース分解真菌を実際に 分離することにも成功した.一方,分離源が消化管にも かかわらず、嫌気性リグノセルロース分解微生物はまっ たく分離されず、この結果は次世代シーケンスで得た菌 叢解析結果と矛盾しなかった.

今後は、本研究で得られ た集積培養物および分離株を、メタン発酵前処理に利用 し、リグノセルロースからのメタン発酵効率化を目ざす.

平成28年度若手研究者助成の研究報告

助成期間:平成28年4月~平成31年3月

環境 DNA メタバーコーディングにより 可視化された祖先的な木材腐朽性 きのこ類の多様性と見えない未知系統

白水 貴

国立科学博物館植物研究部, 現三重大学大学院生物資源学研究科 shirouzy@gmail.com

目的:真菌類は陸上生態系における寄生者や共生者とし て様々な動植物と相互作用ネットワークを構築するとと もに、強力な分解者として物質循環の要を担う生物群で ある.一方、150万種とも1000万種ともいわれる多様 性の大部分が未知の状態にあり、この情報不足が進化生 態学的研究の障壁となっている,真菌類の多様性探索は、 古くは子実体採集に始まり,人工培地を用いた分離培養, DNA メタバーコーディングに代表される環境 DNA 解析 と、技術の進歩とともに発展してきた、これらの方法に はそれぞれ一長一短があり,研究目的に合った方法を選 択する必要がある.しかし、これら3つの方法の比較や 効率的併用についてはほとんど検討されていない.本研 究では、祖先的な木材腐朽性きのこ類であるアカキクラ ゲ類の包括的な多様性探索と系統仮説の補強を目的と し、子実体採集、分離培養、環境 DNA 解析を併用した 調査を行った.

方法:調査地は筑波大学山岳科学センター菅平実験所 (長野県菅平高原)のアカマツ林とした.林内にプロッ ト1(林齢約45年)とプロット2(林齢約70年)を設 定し,2016年~2018年の3年間毎年5月,7月,9月, 11月にアカキクラゲ子実体とアカマツ枯死枝を採集し た.子実体からDNA抽出を行い,PCR後サンガー法に てLSU rDNA配列を得た.アカマツ枯死枝は粉砕後, 改変 Dilution-to-Extinction 法による分離培養に供試し た.アカマツ枯死枝からDNAを抽出し,アカキクラゲ 用プライマーにてPCR後 MiSeq にてLSU rDNA配列を 得た.配列データは類似度97%でクラスタリングし OTU (Operational Taxonomic Unit)とした.系統推定 には RAxML,群集解析には Rを用いた.

結果・考察:合計28 OTU が認められ,子実体採集,分 離培養.環境 DNA 解析でそれぞれ 10.10.27 OTU を 検出した.このうち,環境 DNA 解析が子実体のみで検 出された1OTUを除くすべてのOTUを検出した.系統 推定の結果,環境 DNA 解析が最も多様な系統を検出し ていることが分かった.これらの結果から.今回比較し た3つの方法の中では環境 DNA 解析が最も包括的な多 様性検出法であることが確認された。また、子実体では 検出されず分離培養や環境 DNA 解析でのみ検出される 未知系統が複数確認され、一部は系統樹上で初期に分岐 する進化研究上重要な系統であることが示唆された.こ の結果から、子実体の目視による多様性探索では大型の 子実体を形成しない重要系統を見落としてきた可能性が 指摘される.得られた結果に基づき,各検出方法のバイ アスを考慮した効率的多様性探索、見えない未知系統を 加えたアカキクラゲ類の系統仮説、記載分類的アプロー チと環境 DNA 解析的アプローチの両方の視点から見た 菌類多様性について考察した.
助成研究のその後

大腸菌表層ストレス応答: インプットとアウトプットに働くプロテアーゼの機能

秋山芳展

大腸菌を含むグラム陰性細菌の細胞は、細胞質を囲む 内膜(細胞質膜)とその外側の外膜という二重の膜構造 により覆われている。これら二つの膜に挟まれた領域を ペリプラズム空間と呼び、ここにはペプチドグリカン層 が存在する、これら細胞表層構造は、単細胞生物である 大腸菌にとって「個」と外界を分ける境界であり、生息 環境に存在する有害物質に対する障壁として働く一方. 外界と細胞との間で様々な物質や情報を選択的にやり取 りする場として重要な役割を持つ.細胞外環境の大きな 変化や表層構成因子の生合成過程の異常は、細胞表層の 構造や機能にダメージを与え、それが、細胞機能、ひい ては細胞の生存自体に深刻な影響及ぼすこともある。細 胞はこのような、細胞表層の異常(ストレス)に対応す るために、複数の「表層ストレス応答システム」を備え ている^{1,2}. その中で、 σ^{E} 表層ストレス応答経路は、主 として外膜の機能・構造の維持に関わっており、高温な どに起因する外膜の異常に応答して、外膜タンパク質の 合成を抑制し、また、プロテアーゼや分子シャペロンを 含む細胞表層機能や構造の維持に関わる様々な遺伝子の 発現を誘導する. 我々は, σ^E表層ストレス応答経路に おけるプロテアーゼの関与に注目して研究を進めてお り、2012年度発酵研究所の大型研究助成を受けて、ス トレスシグナルの細胞内への伝達(インプット)に関わ るS2Pファミリー膜内切断プロテアーゼRsePと、スト レス応答により誘導されて外膜タンパク質の品質管理 (アウトプット) に関わるプロテアーゼ BepA に関して

著者紹介:京都大学 ウイルス・再生医科学研究所教授 E-mail:yakiyama@infront.kyoto-u.ac.jp

共同研究者(順不同):秋山光市郎¹,岩間(舛井)千草¹,大門 康志¹,檜作洋平¹,水野慎也¹,宮崎亮次¹,森博幸¹, 禾晃和²,塩田拓也³, Trevor Lithgow³,鈴木健裕⁴, 堂前直⁴,岩木薫大⁵,桜田洋人⁵,Mohammad Shahrizal⁵,田中良樹⁵,塚崎智也⁵,中山慎太郎⁵, 成田新一郎⁶,上久保裕生⁷,林有吾⁷

(¹京都大学 ウイルス・再生医科学研究所,²横浜市立大学大学 院生命医科学研究科,³Department of Microbiology, Monash University,⁴理化学研究所環境資源科学研究センター,⁵奈良 先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科,⁶盛岡大学栄養 科学部,⁷奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科) の研究をおこなった³.本稿では、助成研究の成果とその後の研究経過について概略を紹介する.

σ^{E} 表層ストレス応答経路の誘導に関わる RsePの基質認識・選別機構

 σ^{E} 表層ストレス応答に関わる転写因子(σ 因子)であ る σ^{E} は、通常は1回膜貫通型タンパク質RseAのN末 端側細胞質ドメインに結合して「不活性」状態に保たれ ているが、細胞が異常外膜タンパク質の蓄積などの表層 ストレスにさらされると、まずペリプラズム側に活性部 位をもつ膜プロテアーゼ DegS が活性化されて RseA を ペリプラズム側領域で切断し、これを引き金として RsePがRseAの膜貫通領域を切断する^{4,5,6,7}. RsePは膜 内切断プロテアーゼの一つで、疎水的な膜内部で基質ポ リペプチドを加水分解するという特徴を持つ. RsePに よる切断を受けるとRseA細胞質ドメインとσ^Eの複合体 は膜から離れ、最終的に RseA 細胞質ドメインが細胞質 プロテアーゼにより分解されて、 σ^{E} がストレス応答遺 伝子の転写に働く⁸. RsePは、DegSによる切断で生じ た「RseA 分解中間体」を切断するが、DegS による切 断をスキップして全長の RseA を直接切断することは出 来ない^{4,5,6}. DegSは表層ストレスのセンサーとして働 くため、これは、ストレスに応じたσ^Eの活性化を保証 するための重要な性質である.我々は本助成研究におい て、RsePのPDZドメインに焦点を当ててその機能・構 造の解析を行い、全長 RseA は、そのペリプラズムドメ インがRsePのペリプラズム PDZ ドメインと立体障害を 起こすため、RseP 膜ドメイン内部に存在するプロテアー ゼ活性部位にアクセスできないが、DegSによりペリプ ラズムドメインを切断された RseA は RseP 活性部に到 達し切断され得るようになること、即ち、PDZドメイ ンが基質ペリプラズム領域に対する「サイズ排除フィル ター として働くことで基質の選別をおこなうことを提 唱した^{9,10}(Fig.1,(1)). しかしながら, RsePの基質認識・ 選別がこの機構のみで説明できるのかは不明であった.

【最近の進展】RsePを含むS2Pファミリープロテアー ゼは、一般に2型膜タンパク質(N末端を細胞質に、C

末端をペリプラズムに配向する1回膜貫通型タンパク (質)を基質とする、我々はこの性質を踏まえてスクリー ニングを行い、新たな基質を見出しその解析を進めてい るが、その過程でペリプラズム領域を殆ど持たない2型 膜タンパク質であっても, RsePによる切断を受けない ものが存在すること見出した.即ち、上述のサイズ排除 フィルター機構以外に、基質を認識・選別するための機 構が存在することが示唆された¹¹. RsePの全体構造は未 だ不明だが、古細菌のホモログ miS2P はその構造が明 らかになっている¹². mjS2Pでは, 膜平面内部に位置す る活性部位に隣接して、2本のβストランドからなるルー プ構造 (MRE β-loop と命名) が存在しており, RseP に おいてもこの構造が保存されているものと予測された. 我々は、この領域が基質認識に関与する可能性を考えて 解析を進めた.その結果, MRE β-loop は、基質の切断 に必須であり、この領域が直接基質の膜貫通領域と相互 作用すること、また種々の基質膜貫通領域やMRE β -loopの変異を組み合わせた解析から、MRE β -loopが

基質膜貫通領域の特異的な認識にも関わる事が示唆され た(Fig.1,(2))¹¹. 膜タンパク質の膜貫通領域が通常と るαヘリックス構造はプロテアーゼによる切断を受けに くい. 我々の結果は. 基質の膜貫通領域は伸びた状態で. 恐らくは β ストランド付加機構により MRE β -loop の β ストランドと相互作用し,活性部位へと提示されて切断 をうけることを示唆するものである。さらに、MRE β-loop に隣接し, RsePを含む S2P ファミリー膜内切断 プロテアーゼで保存された領域(C1N領域と名付けた) も部分的に膜に埋もれた配置を取り、直接基質膜貫通領 域と相互作用すること、その変異により基質の切断が阻 害されることもわかった (Fig. 1, (3))¹³. MRE β -loop の 変異とC1N領域の変異を組み合わせた実験等から、基 質はまず C1N と相互作用し、その後に MRE β-loop に受 け渡されるものと考えられる.これらの結果から, RsePの基質は、PDZドメイン、C1N領域、MRE β-loop における複数のチェックポイントを順次経て認識・選別 され、切断されるものと考えている (Fig.1). これら



Fig. 1. Selective substrate recognition by RseP

の領域が実際にどのようにして基質を認識するのか,如 何にして基質切断のキネティクスに寄与しているかを理 解するために,さらに詳細な構造学的及び速度論的解析 等を進める予定である.

ペリプラズムプロテアーゼ BepAの構造と機能

 σ^{E} 表層ストレス応答により複数の細胞表層プロテ アーゼの発現が誘導されるが、そのうち BepA(旧名) YfgC)の具体的機能については不明であった.我々は、 本助成による研究で、BepAが外膜タンパク質LptDの 成熟化と分解の両方に関わる多機能タンパク質であるこ とを明らかにした¹⁴. LptD は外膜のβバレル型タンパク 質であり、リポタンパク質 LotE と複合体をつくって、 リポ多糖(LPS)の外膜表層(外葉)へのアセンブリー 過程に働く¹⁵. LptDは、その生合成の途上では、LptE と複合体を形成した「成熟型 LptD」とは異なるジスル フィド結合を持つ「中間体構造」をとり、ジスルフィド 結合の架け替えを伴って成熟化する^{14,16}. 我々は. BepA がこのLptD 成熟化の促進に働く一方,LptEの枯渇など により LptD のアセンブリーが停滞した結果上記中間体 が蓄積すると、これを分解・除去することを見出した14. このことから、BepAは分子シャペロン様機能(LptD アセンブリー促進)とプロテアーゼ機能(アセンブリー 不全 LptD の分解)の二つの機能を持つものと考えられ る. また, BepAが, 外膜に存在する「外膜タンパク質 組み込み装置(BAM 複合体)」と相互作用することも

示した¹⁴. しかしながら, BepAが如何にしてLptDや BAM 複合体と相互作用し, その分子シャペロン様機能 とプロテアーゼ機能が如何にして使い分けられるのか等 の詳細は不明であった.

【最近の進展】アミノ酸配列の特徴から、BepAはN 末端側にプロテアーゼドメイン、C末端側にTPRドメ インを持つものと推測された. TPRドメインは一般に タンパク質間相互作用に関わる事からこの領域に注目 し、TPRドメインと相互作用するタンパク質を同定す るために、TPRドメイン全体を標的として、部位特異 的 in vivo 光架橋実験を行った¹⁷. 部位特異的 in vivo 光 架橋法では、生細胞内でタンパク質間相互作用をアミノ 酸残基レベルの分解能で解析することができる. この解 析から. TPR ドメインは LptD や BAM 複合体と架橋さ れることが示され、これらとの相互作用に働くことが示 唆された。また、架橋部位の変異解析などから、この相 互作用が BepA の分子シャペロン様機能、プロテアーゼ 機能いずれにも重要であることも示された¹⁷. BAM 複 合体は、「シルクハット型」の構造をもち(Fig.2).外 膜ペリプラズム側でシルクハットのつばに当たる部分が リング状の構造を取る¹⁸. 我々は. BepAのTPRドメイ ンを発現・精製してその結晶構造を明らかに (PDB ID 5X18) し, BAM 複合体構成因子との架橋部位を TPR ド メイン構造上にマッピングした. その結果, TPRドメ インが上記 BAM 複合体のリング構造の中に挿入した配 置をとるものと推定された.その後、さらに BepA 全体 構造の解明にも成功し(PDB ID 6AIT), BepA は分子内



Fig. 2. Structure of BepA

でプロテアーゼドメインとTPRドメインが会合したコン パクトな構造を持つこと、このコンパクトな構造は BepAが機能する時にも維持されていること等を示した ¹⁹. 我々の解明した BepA構造では、プロテアーゼ活性 部位は BepA 分子内部に埋もれており、さらに、「不活 性型」構造をとっていた. BepAがプロテアーゼ機能を 発揮するためには、基質が活性部位にアクセス可能とな ると同時に、活性部位も「活性型」構造へと変化する必 要がある. そのような大きな構造変化は、分子シャペロ ン様機能、プロテアーゼ機能という BepA の持つ2つの 機能の使い分けにも関わることが推測される. これらの 点を明らかにするべくさらなる解析を行っている.

RseP, BepAいずれにおいても、その作用機序の分子 的理解とともに、新たな基質の探索と生理機能の解明を 進めていく必要があるだろう.

文 献

- Mitchell, A. M., and Silhavy, T. J.: Nat. Rev. Microbiol., 17, 417 (2019).
- Grabowicz, M., and Silhavy, T. J.: Trends Biochem. Sci., 42, 232 (2017).
- 3. 秋山芳展: IFO Res. Commun., 28, 51 (2014).
- 4. Kanehara, K. et al.: Genes Dev., 16, 2147 (2002).
- 5. Alba, B. M. et al.: Genes Dev., 16, 2156 (2002).
- 6. Kanehara, K. et al.: EMBO J., 22, 6389 (2003).
- 7. Akiyama, Y. et al.: *EMBO J.*, 23, 4434 (2004).
- 8. Flynn, J. M. et al.: Genes Dev., 18, 2292 (2004).
- 9. Hizukuri, Y., and Akiyama, Y.: Mol. Microbiol., 86, 1232 (2012).
- 10. Hizukuri, Y. et al.: Structure, 22, 326 (2014).
- 11. Akiyama, K. et al.: *eLife*, 4, e08928 (2015).
- 12. Feng, L. et al.: Science, 318, 1608 (2007).
- 13. Akiyama, K. et al.: Mol. Microbiol., 104, 737 (2017).
- 14. Narita, S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 110, E3612 (2013).
- 15. Sperandeo, P. et al.: J. Biol. Chem., 292, 17981 (2017).
- 16. Chng, S. S. et al.: Science, 337, 1665 (2012).
- 17. Daimon, Y. et al.: Mol. Microbiol., 106, 760 (2017).
- 18. Ranava, D. et al.: FEMS Microbiol. Lett., 365, 1 (2018).
- 19. Shahrizal, M et al.: J. Mol. Biol., 431, 625 (2019).

コロニー形成の遺伝学, その後

正木春彦

微生物,特にバクテリアではコロニーを純粋分離して その研究や利用が始まる、試料中の生菌数はコロニー形 成数 cfu から求めるのが常法であり、細菌学で「生きて いる」とはコロニー形成と同義であった.しかし近年. 自然環境で生きているバクテリアのほとんどはコロニー を作らないことが知られるようになった. 明らかにコロ ニー形成は,「生きている」こととは違うのに長年の常 識のためか生物現象として研究されてこなかった。公衆 衛生や食品衛生でも菌の生死は cfu で定義されるので、 背後には100倍の菌が眠っている可能性があるが、「損 傷菌 | として例外視されることが多く、低コロニー現象 が正常な菌の挙動とは必ずしも認識されていない. 我々 はコロニー形成を普遍的な遺伝子発現の問題として捉 え、コロニーを作れない変異株の分離を糸口にコロニー 形成の制限因子を求めた. また低温飢餓時のコロニー形 成能低下が,積極的なストレス応答である証拠を得た.

コロニーを作れない大腸菌変異

コロニー形成にとって広く重要な遺伝子が生存と別に あるならば、コロニーを作れない変異株が大腸菌にもみ つかるはずである.しかし一般に変異株はコロニーとし て分離するので分離法が問題であった.環境試料では液 体培地限界希釈法でコロニー法より多くの菌が得られる ので、液体培養を基準にしてコロニーを作らない変異体 を求めた.試行錯誤の末,大腸菌の温度感受性変異(ts) 株の cfu と液体培養での mpn (most probable number) に着目した.この ts 株集団は高温でコロニーを作らない ので,同じ温度の液体培地でなら増える株を探索した.^{1.2)}

約2600株から期待した表現型のfabB^{ts}株を独立に2 株分離した.FabBは脂肪酸合成系の縮合酵素で,とく に不飽和脂肪酸合成には必須である.しかしts株は形 質がleakyでありゲノム中には化学変異剤による不特定 多数の変異を持つので,改めて野生株からfabBのみ欠 失したΔfabB株を,オレイン酸含有培地上で作製した. これはオレイン酸を加えないL-broth 寒天培地でコロ ニーを作らないが,同液体培地ではわずかに生えた. L-broth中の酵母エキスに微量の脂肪酸が含まれ,その 分だけ液体培養では増えると解釈した.

そこでカザミノ酸グルコース合成培地を使い, 微量の オレイン酸添加時の固体培養と液体培養における増殖度 を追跡したところ, 液体培養では増えるのに, アガロー ス培地ではコロニーどころか増殖そのものが見られな かった (Fig. 1). これにより大腸菌は, 不飽和脂肪酸の 供給不足により, 特に固体培養での増殖が抑えられるこ とが判明した.²⁾

コロニー変異からの拡張²⁾

変異株は得られたが、問題は野生株である.野生型大 腸菌は脂肪酸を合成できるので合成培地でもよく生え る.しかし、もし脂肪酸供給が不足すればどうなるか? そして他のバクテリアでは?

- (1) 野生型でもしfabB発現が落ちると:発現調節可能に したfabB遺伝子をminiFプラスミドでΔfabB株に導 入した.fabBを高発現させるとコロニー形成頻度は 液体培養と同等だが,fabB発現を落とすと液体培養 に比べてコロニー形成頻度が大きく落ちた.野生株 でも、もし脂肪酸供給が不足すればコロニー形成し にくくなると推定できる.
- (2) 自然環境では脂肪酸欠乏状態か:大腸菌を低温飢餓 に保つと cfu が経日的に低下していく. その cfu 測定



Fig. 1 Cell proliferation of strain Δ*fabB* in M9-Casamino acidsglucose-based solid and liquid media containing 0.01, 0.075, 1.0, or 20µg/mL oleic acid. After incubation at 37℃ as indicated, cells were collected from each plate or liquid medium for counting of colony-forming cells.

著者紹介:東京大学大学院新領域創成科学研究科特任研究員 E-mail: amasaki@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

用の平板合成培地にオレイン酸を添加すると、コロ ニー数が有意に上昇した.大腸菌は野生株でも、飢 餓状態の自然環境では実際に脂肪酸欠乏状態にある と推定できる.

- (3) 薬剤での脂肪酸合成阻害では:FabBを阻害する抗 生物質セルレニンを大腸菌に加えると、液体培養の 生育頻度に比ベコロニー形成頻度が大きく下回った. この方法は大腸菌以外に拡張できる.枯草菌にセル レニンを与えてもコロニー形成が特異的に抑えられ た(枯草菌での標的はFabBでなくFabF).脂肪酸 合成系の別酵素FabIを阻害する抗菌剤トリクロサン でも、大腸菌だけでなく(Fig.2)枯草菌やコリネバ クテリウムでもコロニー形成が特異的に抑えられ、 その抑制はオレイン酸添加で解消された.
- (4) 応用例として:森林土壌抽出液から1/10濃度 L-broth アガロース平板培地を使ってコロニー形成さ せる際,20µg/mlのオレイン酸とパルミトレイン酸 を加えると、コロニー数が8倍に上昇した.生じた コロニーの多様度は脂肪酸の添加で低下しておらず、 脂肪酸を好む特殊な菌が生えたのではなく、コロニー 数全体が底上げされたと考えられる.

以上から,バクテリアは一般に脂肪酸欠乏になるとコ ロニーを作りにくくなり,飢餓環境では脂肪酸欠乏がコ ロニー数低下の一因であると推定された.液体増殖に比 べて固体増殖が抑えられる理由や,直接の作用因子は未 詳である.作用する不飽和脂肪酸の作用域は20µg/mL 以下の低濃度なので,実際の結果は使用する培地等に依 存するであろう.



Fig. 2 Comparison of culturability of *E. coli* MG1655 in solid and liquid media with reduced activity of enoyl-ACP reductase by the addition of triclosan. cfu and mpn were determined after incubation at 37℃ for four days in M9CAGlc-based solid and liquid media containing various concentrations of triclosan as indicated.

コロニーを作らなくなる現象の遺伝子関与³⁾

環境下でコロニー頻度が低下する原因を, コロニー変 異とは逆のアプローチから探った. 仮説として, コロニー 形成能の維持には増殖とは別の特定の遺伝子が必要で, 低温飢餓に曝すとその遺伝子の機能/産物が減衰するた めコロニー頻度が低下していくであろう, その発現を強 化すれば, 低温飢餓にしてもコロニー形成能が維持され るのではないかと考えた. そういう遺伝子を得るため, 大腸菌の全遺伝子をベクターで高発現できる ASKA ライ ブラリーを用いた.

全クローンを混合培養したのち低温飢餓に曝すと,集 団のコロニー形成率が低下していくに従って,コロニー 形成能を保つ目的遺伝子を高発現する細胞が集団中で濃 縮される.様々な程度の効果を示す株が得られ,定常期 や飢餓ストレス時に働く転写因子 RpoSの発現株も含ま れていたが,一番効果が高かったのは cAMP の分解酵 素 CpdA の発現株であった.

これはコロニー形成能の維持に、cAMPはマイナス要 因ということだろうか? cAMPは受容体 CRPと結合し て各種の糖代謝を調節する多機能転写因子となるが、コ ロニー形成にも関与しているのか?そこで cAMPの合 成酵素欠損株 Δ*cyaA* と CRP 欠損株 Δ*crp* を調べると、い ずれを低温飢餓に長く曝してもコロニー形成能が全く低 下しなかった.また Δ*cyaA* 株の前培養液に cAMP を加 えると、その濃度に応じて低温飢餓によってコロニー形 成が低下するようになった.

仮説通り、ストレス下でもコロニー形成能の維持に働 く *rpoS*のような遺伝子は取れてきたが、*cpdA*は意味が 違う.ストレス時にコロニー形成能を積極的に落とす仕 組みが隠れていて、そのスイッチである cAMPを高発 現の CpdA が壊したらしい.一般に低温飢餓時にコロ ニー形成能がなくなっていくのは、必要な能力が失われ ていく面とは別に、最終的な生存のため cAMP が「冬眠」 を積極的に誘導しているようだ.脂肪酸の必要性とはお そらく独立の、その下流の仕組みに興味が持たれる.

麓に辿り着いただけで遺伝学と称するのはおこがまし
いが、その前の努力段階にあった私どもに対して研究助
成を給わったことに心より感謝致します。本研究は、東
京大学農学生命科学研究科の当時の多くの学生諸君のリ
レーで進めることができました。本文の範囲に限り敬称
略で紹介し謝意を表します。変異株は安原幸司、池端佑
仁、三井智玄、納庄一樹;cAMP関係は高丸玲子、福嶋
凡子;納庄一樹が再実験を含めまとめました。

- 1) 正木春彦: コロニー形成の遺伝学, IFO Res. Coomun.,28, 15 (2014).
- 2) Nosho, K. et al.: Microbiol.164, 1122 (2018).
- 3) Nosho, K. et al.: Microbiol.164, 164 (2018).

レアメタル気化微生物の分離・同定と機能解析(その2)

山下光雄

はじめに

レアメタルはデジタル家電や電気自動車のモーターの 材料として重要な元素であり、需要が伸びている. レア メタルは特定国に偏在し、囲い込みがされるために、レ アメタル消費国である日本では安定供給に向けた対策が 望まれている.

廃水や廃棄物からのレアメタル回収を可能とする戦略 として、微生物による金属代謝(メタルバイオテクノロ ジー)の活用を提案している.生物のもつ高選択性を活 かすことで、メタルバイオテクノロジーは廃水や廃棄物 から金属を浄化・回収する技術であると考えている.メ タルバイオテクノロジーの中でも生物気化(バイオボラ タリゼーション)は、回収技術の活用が期待されている 機能の一つである.バイオボラタリゼーション能を有す る微生物の分離やその応用に成功すれば、既存技術では 困難とされている廃水や廃棄物からのレアメタルの再利 用が可能となる.

セレン酸還元微生物

セレン(Se)は、主にガラス染色や太陽電池の半導体材料として重要なレアメタル資源である。有毒な可溶性のSe酸化物イオンを含む廃水が発生しているため、物理化学処理により浄化されている。この処理は大量の薬剤の投入と汚泥が発生するという欠点がある。本汚泥はSe含量が低いため、Seを回収・資源として再利用する事は難しく、廃棄されている。

セレン浄化を目的にセレン酸還元細菌 Pseudomonas stutzeri NT-Iを単離した.NT-Iは水溶性セレン酸や亜セ レン酸を不溶性の無毒な元素態セレンに還元し,その元 素態セレンを揮発性ジメチルジセレニド(DMDSe)に 還元する.NT-I株の保有する元素態セレンからDMDSe へのバイオボラタリゼーション反応を利用すれば,廃水 や廃棄物中に存在する Se を容易に高純度に回収できる 可能性がある.

気化セレン生合成の培養工学的解析

セレン酸模擬廃水を用いて、セレン気化物生成におけ る NT-Iの培養最適化試験を行った。その結果培養温度 38℃, pH9.0, 通気量 1L⁻¹min⁻¹, 撹拌速度 250 rpm であっ た. 実廃水を用いて最適化条件でSe気化回収試験を行っ た結果、処理120時間で初期セレン濃度の約39%に当 たる DMDSe を回収した. 模擬廃水での回収率約71% と比較すると、実廃水での回収率は約半分まで減少した. 処理後の実廃水中のセレン量から推定すると、気体回収 率の低下はDMDSe が可溶性セレンとして培養液に残存 していたからであると考えられる. この可溶性画分に含 まれる DMDSe がすべて気体セレンとして回収できる と、回収率は初期セレン濃度の約65%になり、模擬廃 水使用時の回収率と同等である.本実験の模擬廃水には 存在しないで実廃水に存在する揮発化阻害要因を解明で きれば、セレン気化回収率が高くなると思われる.回収 した Se を再資源化するために、硝酸中で溶解し不揮発性 のメチルセレニン酸に変化した Se 資源化の検討を行っ た。脱硝酸化、アルカリ化、酸化還元によって、回収率 25%. 純度 99.7%の元素態セレンの精錬に成功した.

気化セレン生合成の遺伝子工学的解析

DMDSe は Se にメチル基が結合した構造から,NT-I ゲノム DNA からメチル基転移に関与する遺伝子を探索 し,DMDSe の合成に関与する遺伝子 menGを発見した. menGを PCR 増幅後,TA ベクターに連結したプラスミ ド pGEM-MemG を作製した.次にラクトースプロモー ターの下流にDMDSe 合成酵素のカルボキシ末端に His-Tag を 化学 修 飾 した 遺 伝子 ME-His を 組 換 えた Escherichia coli DH5a(lac-ME-His)を構築した.NT-I と E. coli DH5a(lac-ME-His)を構築した.NT-I と E. coli DH5a(lac-ME-His)を構築した.NT-I と 度を分析した.初発可溶性セレン濃度が 37.8 mg/L で あり,NT-I も E. coli DH5a(lac-ME-His)も経時的にセ レン濃度が減少し,168 時間においては可溶性セレン濃

著者紹介:芝浦工業大学工学部教授

E-mail : yamashi@sic.shibaura-it.ac.jp

度が各々11.9mg/Lと12.0mg/Lに減少した. 両株とも 不溶性セレンは24時間でピークに達し, その後168時 間では6.0mg/Lまで減少した. 以上の結果から, 組換 え大腸菌は168時間後に約50%のDMDSeを合成した と示唆された.

テルル酸還元微生物のスクリーニング

テルル (Te) は電子材料に用いられるレアメタルの一 鉱種であり、産業利用量が増えるとともに、環境中への 排出も増加している. 廃水中から水溶性のTe (テルル 酸(VI)、亜テルル酸(N))の浄化回収技術開発が望ま れている. 高塩濃度工場廃液からの技術開発を目指し、 耐塩性テルル代謝微生物に注目し、海洋環境試料から網 羅的に分離し、属種の同定と特徴解析を目的とした. 微 生物の分離源として、東京湾、遠州灘金の瀬、新潟沖の 総計14ヶ所から海水および海底堆積物を採取した. その 結果、東京湾から24株、遠州灘金の瀬から22株、新潟沖 から6株計52株のテルル酸還元微生物を分離した. この うち、18株は0.4mM テルル酸含有マリン培地で72時 間培養後の溶存テルル除去率が50%以上であった. 分離 株のうち18株はSulfitobacter属, Ruegeria 属, Hoeflea 属, Alteromonas 属, Marinobacter 属, Pseudoalteromonas 属, Shewanella 属, Idiomarina 属, Vibrio 属 の9属13種の 細菌の16SrRNA遺伝子配列と98%以上の相同性を示し た. このうちSulfitobacter 属, Ruegeria 属, Alteromonas 属, Marinobacter 属, Idiomarina 属, Vibrio 属の6属には, 調べた限りではテルル酸や亜テルル酸を還元する微生物 の報告はなかった.分離株の内Sulfitobacter sp. strain TK39Bは4%塩化ナトリウム存在下で最も高い溶存テ ルル除去率82%を示し,X線解析より元素態テルルを 固化物として合成していることが分かった.以上の結果 から,海洋環境の至る所にTeの浄化回収に利用できる 耐塩性テルル酸還元能を持つ多様な細菌が存在している ことを明らかした.

おわりに

メタルバイオテクノロジーは現在鉱業におけるバイオ リーチングや金属含有廃水・廃棄物処理といった一部分 に用いられているに過ぎない.新酵素や遺伝子が発見さ れ、それらに基づいた新規な金属代謝反応が多数見出さ れている.バイオボラタリゼーションなどレアメタル浄 化回収技術は廃水や廃棄物から有価資源を回収資源化す る特色のある手法であり、「循環型社会」形成の一助と なると期待できる.

発酵研究所助成研究報告集 第33号【非壳品】 令和元年12月10日 印刷 令和元年12月20日 発行 編集委員長 横田 明 金子嘉信, 左子芳彦, 永井和夫 編集委員 西山 真,福田雅夫 発行人 樽井直樹 発行所 公益財団法人発酵研究所 大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 TEL. 06 - 6300 - 6555 FAX. 06 - 6300 - 6814 印刷所 日本印刷出版株式会社 大阪市福島区玉川4丁目7-13

