

令和 2 年 9 月 10 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860637

氏 名 阪中 幹 祥

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: Lyngby (国名: デンマーク)
2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
合成生物学的アプローチで切り拓く宿主と腸内細菌の共生進化論
3. 派遣期間: 平成 30 年 9 月 1 日 ~ 令和 2 年 8 月 13 日
4. 受入機関名及び部局名
National Food Institute, Technical University of Denmark
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

本研究は、腸内細菌と宿主が如何にして共進化を遂げてきたのかを解明することを目的とした。具体的には、乳児の代表的な腸内細菌種であるビフィズス菌の代謝産物や糖質利用に主に焦点を当て、合成生物学・遺伝学・生化学的手法などを駆使することで、ビフィズス菌がヒト腸内に生息する理由・生理的意義を明らかにすることを試みた。

「成果①」

腸内細菌の代謝物産生に関わる遺伝子の機能解析

ビフィズス菌において、乳酸デヒドロゲナーゼ(ピルビン酸から乳酸への変換を担う酵素)と機能が推定されている遺伝子を破壊した。遺伝子破壊法として、相同組換え法を利用した非複製プラスミドの挿入変異導入系を採用した。ビフィズス菌で複製できないプラスミド(スペクチノマイシン耐性遺伝子と大腸菌レプリコンを含む DNA 配列)に、標的遺伝子の内部 DNA 配列(約 500 bp)をクローニングした。完成したプラスミドをビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* にエレクトロポレーション法により導入し、標的遺伝子とプラスミドの相同配列間で組換えが生じた挿入変異株をスペクチノマイシンにより選択した。目的の遺伝子変異が生じていることは PCR およびサンガーシークエンシングにより確認した。また、その遺伝子の機能を正確に解析するために、複製プラスミド(クロラムフェニコール耐性遺伝子、大腸菌レプリコン、ビフィズス菌レプリコンを含む DNA 配列)を介して、破壊した遺伝子を変異株にエレクトロポレーション法により導入した。作出した株を相補株として使用した。

野生株、変異株および相補株を *in vitro* で培養し、各株の表現型を解析したところ、株間で増殖能や培養上清中の乳酸産生能に大きな違いが見られなかった。ある細菌種において、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のホモログは、芳香族ピルビン酸から芳香族乳酸へと変換する機能を有することが報告されている。そこで、野生株、変異株および相補株の培養上清中の芳香族乳酸量を解析したところ、その量は変異株において有意に低下していることが明らかとなった。こ

のことから、今回破壊した遺伝子は、芳香族乳酸の産生に寄与していることが示された。

さらに、当該遺伝子にコードされている酵素を大腸菌内で発現・精製し、その機能を生化学的手法により解析した。その結果、当該酵素は芳香族ピルビン酸を基質として芳香族乳酸を合成することが明らかとなった。特に、芳香族ピルビン酸の中でも、インドールピルビン酸に効率良く作用することが分かった。またその他に、当該酵素は二量体を形成していること、調べた限り金属要求性はないこと、至適 pH は 8.0-8.5 であること、温度は 37 度で最も高い安定性を示すこと、リン酸が酵素活性に影響を及ぼすことなどが明らかとなった。以上の結果より、当該酵素を芳香族乳酸デヒドロゲナーゼと命名した。インドールピルビン酸から合成されるインドール乳酸は、宿主の芳香族炭化水素受容体 (AhR) の活性化を介して、宿主の免疫調節などに関与することが知られている。また、この芳香族乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子は、乳児腸内に生息するビフィズス菌 (乳児型ビフィズス菌 [*B. longum*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. breve* など]) のゲノムに特異的に保存されている。すなわち、成人や動物の腸内に生息しているビフィズス菌のゲノムには当該遺伝子は保存されていない。この結果を反映するように、最近の研究では、ビフィズス菌の中でも乳児型ビフィズス菌のみがインドール乳酸を産生できること (Sakurai et al., 2019, *Microorganisms*, 7:340)、および、乳児糞便においてビフィズス菌が多い場合、インドール乳酸も同糞便中に大量に存在することが報告されている (Ehrlich et al., 2018, *FASEB J*, 32:1b359)。我々のグループにおいても、これらと同様の結果を得ているのに加えて、乳児糞便サンプルを供した AhR レポーターアッセイ系により、乳児糞便中のインドール乳酸量と AhR 活性に正の相関があることを見出している。以上の結果より、乳児型ビフィズス菌が芳香族乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を進化の過程で獲得したことは、ビフィズス菌と乳児の共生を支えるうえで重要なイベントであったことが強く示唆された (Laursen, Sakanaka et al., 2020, *bioRxiv*, 2020.01.22.914994)。今後は、芳香族乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を元々持たないビフィズス菌に、当該遺伝子の様々なホモログを導入した株 (合成生物学的に代謝改変した株) を作出し、個々の株の特性評価を進めていくことを予定している。

「成果②」

ビフィズス菌におけるヒト母乳オリゴ糖利用関連遺伝子の保存性解析

母乳栄養児の腸内ではビフィズス菌が優勢な細菌叢が形成される。これは、ビフィズス菌がヒトの母乳に含まれているオリゴ糖 (ヒト母乳オリゴ糖; HMO) を利用できるためと考えられている。HMO は百種類以上のオリゴ糖 (三糖以上) の総称であり、これまで HMO の利用に関する多数の遺伝子がいくつかのモデルビフィズス菌株を用いて同定されてきた。しかしながら、それらの遺伝子ホモログが各ビフィズス菌種・株においてどのように保存されているのかは十分に分かっていなかった。本研究では、各ビフィズス菌種・株における HMO 利用関連遺伝子の保存性を明らかにし、各ビフィズス菌種・株の HMO 利用能の特徴を理解することを目指した。

計 16 種のビフィズス菌種における、HMO 利用関連遺伝子ホモログ (ホモログの基準: 同一性 $\geq 70\%$ 、クエリカバレッジ $\geq 60\%$ 、および e 値 $< 1 \times 10^{-50}$) の保有率を調査した。具体的には、計 20 種類以上の既報の HMO 利用関連遺伝子をクエリとして用いて、それぞれの遺伝子ホモログが計 565 株のビフィズス菌のゲノムに存在するかを *tblastn* 解析により調べた。各ビフィズス菌種における各遺伝子の保有率 (%) は、上記の基準でヒットした遺伝子ホモログの数を供試したゲノムの数で割って算出した。

解析の結果、HMO 利用関連遺伝子は、乳児型ビフィズス菌のゲノムに特異的に保存されており、他のタイプのビフィズス菌 (成人やヒト以外の動物の腸に生息するビフィズス菌など) のゲノムには殆ど存在しないことが明らかになった (図 1)。また、乳児型ビフィズス菌は、HMO を利用するために二つの異なる戦略 (細胞内分解または細胞外分解戦略) を取っているが、*B. bifidum* および一部の *B. longum* 株は、細胞外 HMO 分解酵素の遺伝子ホモログを保有していることが明らかとなった。すなわち、これらの株は、HMO から単糖または二糖を細胞外で遊離し、その後、それらの糖を取り込み、細胞内で代謝していると考えられた。その他の乳児型ビフィズス菌は、HMO 利用関連遺伝子がいくつか検出されたものの、細胞外分解酵素遺伝子を一切持っていなかった。すなわち、これらの株は、HMO をそのまま直接取り込み、細胞内で分解する戦略を取っていると考えられた。

B. bifidum と *B. infantis* には、幅広い種類の HMO 利用関連遺伝子が保存されていた。この結果は、これら二種のビフィズス菌が *in vitro* での培養試験にて、最も高い HMO 利用能力を示すという過去の知見とよく一致していた。その他の乳児型ビフィズス菌種に関しては、基本的には、保存されている HMO 利用関連遺伝子の種類が限られていた。しかし、株によっては、多種類の HMO 利用関連遺伝子が保存されている場合もあった。実際に、*B. bifidum* と *B. infantis* 以外の乳児型ビフィズス菌の HMO 利用能力は、株によってある程度異なることが知られている。例えば、殆どの *B. breve*、*B. longum*、*B. pseudocatenulatum* 株は、利用可能な HMO 分子種の種類が限られているが、一部の株は多種類の HMO 分子種を利用できることが報告されている。以上より、HMO 利用に関する遺伝子が各ビフィズス菌種・株でどのように保存されているのかを明らかにすることに成功し、ビフィズス菌の HMO 利用能に関する知見を整理することができた (Sakanaka et al. 2020, *Nutrients*, 12:71)。今後は、一つひとつのビフィズス菌株の HMO 利用能力とその分子機構を明らかにしていくことで、ビフィズス菌の多様な HMO 利用戦略の全貌を明らかにできると考えられる。

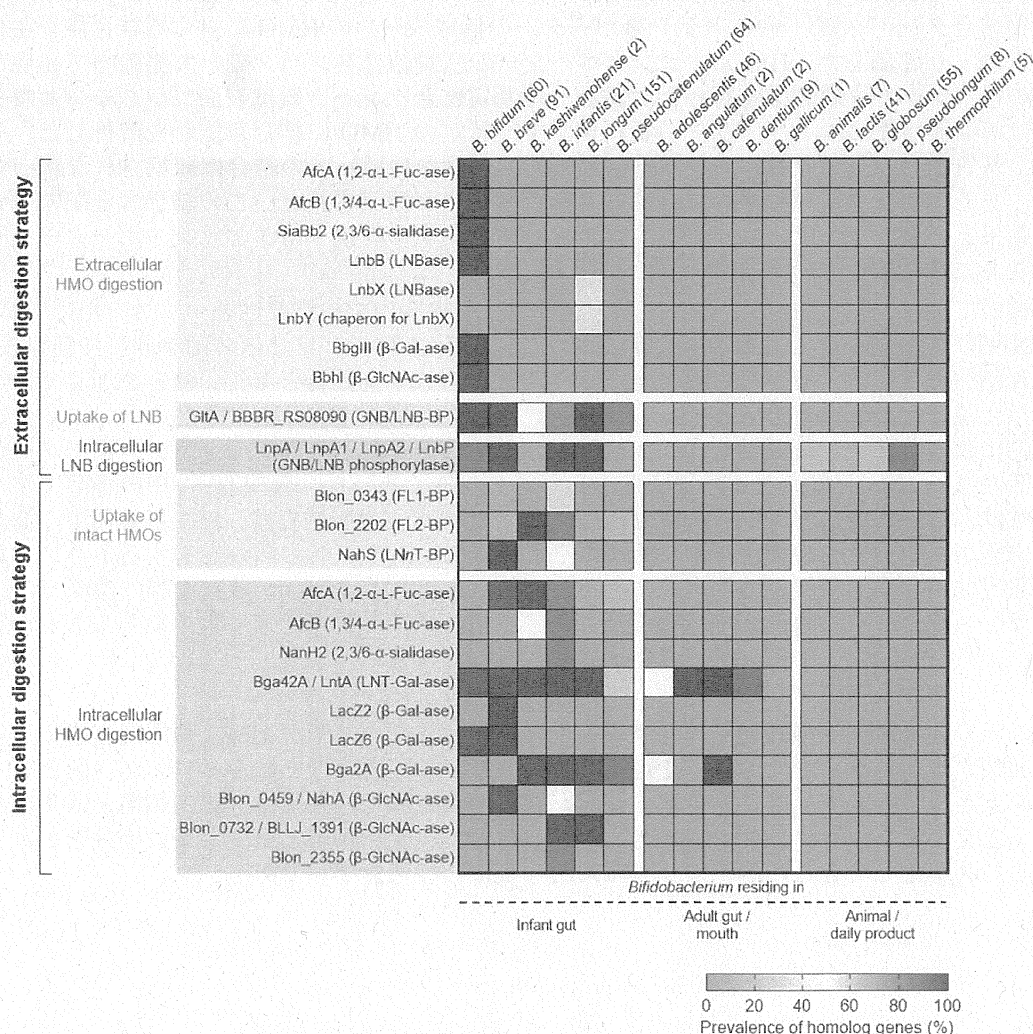


図 1. 各ビフィズス菌種における HMO 利用関連遺伝子の保有率

計 16 種のビフィズス菌種における、HMO 利用関連遺伝子ホモログ (ホモログの基準: 同一性 $\geq 70\%$ 、クエリカバレッジ $\geq 60\%$ 、および e 値 $< 1 \times 10^{-50}$) の保有率を調査した。具体的には、各 HMO 利用関連遺伝子をクエリとして用いて、当該遺伝子ホモログが計 565 株のビフィズス菌のゲノムに存在するかを tblastn 解析により調べた。各ビフィズス菌種における各遺伝子の保有率 (%) は、上記の基準でヒットした遺伝子ホモログの数を供試したゲノムの数 (図中の括弧内に記載される数) で割って算出した。結果はヒートマップで示される。Sakanaka et al. (*Nutrients*. (2020) 12:71) より一部改変転載 [©2019 MDPI (Licensed under CC BY; <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)].

「成果③」

新規なヒト母乳オリゴ糖利用関連遺伝子の同定

上述の成果より、ビフィズス菌の HMO 利用関連遺伝子に関する知見を整理することが出来たものの、まだ未同定の HMO 利用関連遺伝子はいくつか存在する。そこで、ビフィズス菌の新たな HMO 利用戦略を明らかにすることを目指して、新規な HMO トランスポーターの同定を進めた。

HMO トランスポーターの機能評価は異種発現にて行った。当該異種発現系では、HMO を取り込めないが細胞内に HMO 分解酵素を持つように合成生物学的手法により改変した *B. longum* 株を宿主として用いた。本株に、HMO トランスポーター (ABC トランスポーター) の候補遺伝子を導入し、異種発現することで、HMO 存在下で生育可能となるかを解析した。その結果、空ベクター導入株では HMO 存在下で生育できなかったものの、数種のトランスポーター異種発現株では HMO 存在下で生育が大幅に上昇した。続いて、これらの ABC トランスポーターの基質結合タンパク質 (ABC トランスポーターの構成成分) の HMO に対する結合能を生化学的解析により評価した。HMO トランスポーターの基質結合タンパク質を大腸菌内で発現させ、その後、タンパク質精製を行った。精製した基質結合タンパク質は表面プラズモン共鳴分析または等温滴定型カロリメトリー分析に供して、特定の HMO に結合可能かを解析した。その結果、基質結合タンパク質はラクトース (HMO ではない糖) への結合は観察されなかったものの、ある HMO 分子種に対しては高い効率での結合が観察された。この結果は上記の生育試験の結果と一致していた。以上より、ビフィズス菌由来の新規 HMO トランスポーターを同定することに成功したといえる。

続いて、特定した HMO トランスポーター遺伝子の腸内での重要性をマウスを用いて調べた。AIN-93G を通常食として摂取した無菌マウスに、計 2 株のビフィズス菌を同時に経口投与し、それに加えて 1.0% (w/v) HMO を含む水を与え続けた。対照群として、糖を添加していない水を与え続けた。なお、同時投与した 2 株のビフィズス菌は、HMO を取り込めないよう合成生物学的に改変した *B. longum* 株に、HMO 取り込み活性がそれぞれ異なるトランスポーター遺伝子 (活性は *in vitro* 実験により評価済み) を導入した株であった。糞便 DNA 中の各ビフィズス菌の数は、定量 PCR により経時的に測定した。その結果、対照群では、マウス糞便中の 2 菌株の数に差がなかったものの、HMO 摂取群では高い HMO 取り込み活性を有するトランスポーター発現株がマウス糞便中で優占的になっていた。以上より、HMO が豊富な腸内環境では、HMO トランスポーターの取り込み活性の高さがビフィズス菌の腸内増殖に重要であることが実証された。

以上の成果や過去の知見を統合すると、乳児型ビフィズス菌が HMO 利用関連遺伝子や芳香族乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を進化の過程で獲得してきたことは、ビフィズス菌とヒトの共生を支える重要なファクターであることが強く示唆された。今後は、腸内細菌と宿主の共生を支える更なるファクターを引き続き同定することで、腸内細菌と宿主が長い年月をかけて如何にして共進化してきたのかをより詳細に明らかにしていく予定である。