

ヒト・動物の腸内に生息する嫌気性細菌の代謝機能に関する研究



東京大学大学院農学生命科学研究科・応用生命工学専攻 山田千早

はじめに

嫌気的な環境は、水田や深海といった自然環境から、身近なところではヒト・動物の消化管内にまで広く分布している。そこに生息する嫌気性細菌は、様々な基質を利用可能であり発酵や嫌気呼吸によってエネルギーを獲得する。その多様な代謝機能に興味を持ち研究を行なっている。その中で、ヒト・動物の腸内細菌を対象とした新規酵素の構造解析、またメタン生成を担うメタン生成古細菌と発酵性細菌の機能解析を行なうことで、嫌気性細菌の新たな機能の一端を明らかにした。

1. 乳幼児型ビフィズス菌由来ヒトミルクオリゴ糖分解酵素の結晶構造解析

母乳中には、重合度3以上のオリゴ糖が初乳中には20 g/L程度、常乳中には10 g/L程度含まれており、ヒトミルクオリゴ糖 (Human milk oligosaccharides, HMOs) とよばれている。HMOsはヒトの母乳に特異的であり、その生理機能の一つとして、腸管内におけるビフィズス菌の選択的増殖作用が明らかになってきた。HMOsの主要骨格として多く存在しているのがラクト-N-ビオース I (Gal-β1,3-GlcNAc, 以下LNB) であり、乳幼児型ビフィズス菌はLNBを特異的に代謝する能力を有する。この代謝経路上において最も重要な酵素が、HMOからLNBを遊離する酵素『ラクト-N-ビオシダーゼ (以下LNBase)』である (図1)。当時、2種の乳幼児型ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* と *B. longum* subsp. *longum* がその酵素を特異的に有していると考えられていた。最初に *B. bifidum* 由来のLNBase (LnbB) が発見され立体構造が報告された^{1,2)}。その後 *B. longum* のLNBase (LnbX) が発見されたが、LnbXのアミノ酸配列は全く新規なものであった³⁾。LnbX触媒ドメイン 31-625の立体構造を分解能1.82 Åで反応生成物LNBとの複合体構造として決定し、構造情報に基づいて反応メカニズムを明らかにした (図2)⁴⁾。触媒ドメインの構造が明らかになったことにより糖質加水分解酵素ファミリーの中で新たなファミリー GH136を提唱するに至った (<http://www.cazy.org/GH136.html>)。また、反応に重要なアミノ酸残基を明らかにしたことで、これまで乳幼児型のビフィズス菌のみが活性を有すると考えられていたが、ビフィズス菌に限らずヒト腸内細菌もLNBase活性を有していることが示唆され、新規な基質特異性を有するGH136

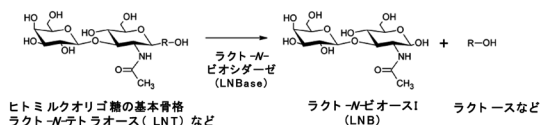


図1. ラクト-N-ビオシダーゼが担うエキソ型の加水分解反応 (保持型)

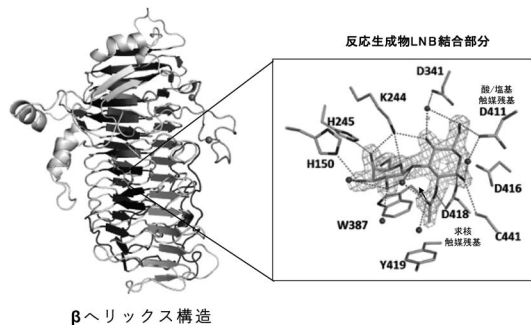


図2. *Bifidobacterium longum* 由来のGH136に属するラクト-N-ビオシダーゼ (LnbX 31-625) の結晶構造

酵素の発見にもつながる研究となった。

2. 腸内細菌由来ヒトミルクオリゴ糖分解酵素の結晶構造解析

LnbXのホモログがビフィズス菌以外にも存在していることを見出し、Firmicutes門に属する腸内細菌由来のLNBaseの機能解析と立体構造に成功した。最近、離乳期に主要な *Roseburia* 属細菌や *Eubacterium* 属細菌がHMOsを利用することがわかってきた⁵⁾。それらは腸内で酪酸を生成することでヒトの健康に寄与することが示唆されている。HMOを利用可能なのは乳幼児型ビフィズス菌だけでなく、その後の離乳期、つまりビフィズス菌優勢だった乳児の腸内細菌叢から一部の細菌が置き換わり成熟した成人の腸内環境へと移行する時期に *Roseburia* 属細菌や *Eubacterium* 属細菌といった酪酸を生成する腸内細菌がHMOを利用する機能を有し、成人の腸内細菌叢形成初期の段階で腸管において有利に増殖しているのではないかと考えられる。

上述した新規なLnbXホモログを発見したデンマーク工科大学 (DTU) と共同研究を行い、*Eubacterium* 属細菌由来のLNBaseの立体構造解析に成功した。分解能2.0 Åで反応生成

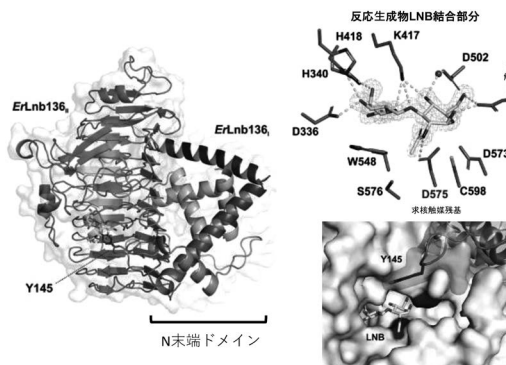


図3. ヒト腸内細菌 *Eubacterium ramulus* 由来のGH136に属するラクト-N-ビオシダーゼ (*ErLnb136*) の結晶構造

物LNBとの複合体構造を明らかにした(図3)⁵⁾。このLNBaseは興味深いことに他のGH136に属するLNBaseが専用のシャペロン(別のORF)を必要とするのに対し、それを必要としないこと、その代わりとなるシャペロン様の配列がN末端ドメインに存在することがわかった。構造解析の結果からN末端ドメインのY145が活性中心に近い位置に存在し、活性に重要であることが示された。また、これまでのGH136に属するLNBaseのほとんどは菌体外に局在するが、本酵素は菌体内に局在する点も異なる。つまりラクト-N-テトラオースを菌体内に取り込んだ後に作用するということであり、ラクト-N-テトラオースを丸ごと取り込んだ後に末端から徐々に切って単糖にしていく乳児型ピフィズ菌*B. infantis*とは異なる方法で利用している点も興味深い。

3. 高温メタン生成細菌群集における導電性酸化鉄マグネタイト添加による単鎖脂肪酸の分解促進効果

メタンは様々な嫌気環境から発生している。その中でも家畜の消化管内容物はメタン発生にかかわる重要な微生物源の一つである。メタン発酵技術は、家畜の排泄物や生ゴミなどの有機性廃棄物からメタンガスとしてエネルギー回収することが可能であるため注目されている。高温メタン発酵は中温のものよりも処理速度が早いのが特徴であるが、単鎖脂肪酸が蓄積しやすいため安定化・高効率化については課題が残されている。そこで、導電性酸化鉄マグネタイトを高温メタン発酵汚泥に添加することで、酢酸およびプロピオン酸の分解促進がみられることを明らかにした⁶⁾。このことから、高温条件においても中温条件で知られていたマグネタイトによる微生物間の電子移動反応促進(電気共生)が生じていること、酢酸分解菌*Tepidanaerobacter*の近縁種およびメタン生成アーキア*Methanosarcina*の近縁種が電気共生を行っていることを示した(図4)。短鎖脂肪酸の蓄積が問題となっていた高温メタン発酵において、マグネタイトの添加により酢酸およびプロピオン酸分解に伴うメタン生成を促進させるという結果は、高温メタン発酵の安定化・高効率化につながり、実用的プロセスを考える上で重要な知見となった。また、電子を受け取る側の高温メタン生成細菌*Methanosarcina thermophila*が鉄還元能を有し、不溶性の酸化鉄に電子を渡すことが可能であるという新規な機能を明らかにした⁷⁾。

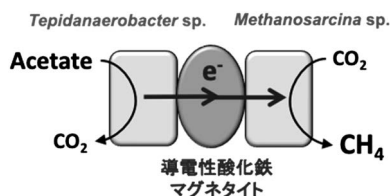


図4. 酢酸からのメタン生成を促進させるマグネタイトを介した電気共生関係

おわりに

嫌気性細菌の多種多様な機能に魅了されて研究を行っている。将来的には嫌気性細菌由来の新規な酵素の機能構造を明らかにしつつ、ヒト・動物の健康に寄与するといった応用展開を視野に入れて研究を行っていきたく考えている。

(引用文献)

- 1) Wada J. *et al.* *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 (2008).
- 2) Ito T. *et al.* Crystal structures of a glycoside hydrolase family 20 lacto-*N*-biosidase from *Bifidobacterium bifidum*; *J. Biol. Chem.*, 288, 11795–11806 (2013).
- 3) Sakurama H. *et al.* 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 (2013).
- 4) 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., and Fushinobu S. Molecular insight into evolution of symbiosis between breast-fed infants and a member of the human gut microbiome *Bifidobacterium longum*; *Cell Chemical Biology*, 24, 515–524.e515 (2017). *equal contribution
- 5) Jakob P. M.*, Yamada C.*, Shuoker B., Alvarez-Silva C., Gotoh A., Louise Leth M., Schoof E., Katoh T., Sakanaka M., Katayama T., Jin C., G. Karlsson N., Arumugam M., Fushinobu S., and Hachem A. M. Butyrate producing Clostridiales utilize distinct human milk oligosaccharides correlating to early colonization and prevalence in the human gut; *Nature communications*, 11, 3285 (2020). *equal contribution
- 6) Yamada C., Kato S., Ueno Y., Ishii M., and Igarashi Y. Conductive iron oxides accelerate thermophilic methanogenesis from acetate and propionate; *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 678–682 (2015).
- 7) Yamada C., Kato S., Kimura S., Ishii M., and Igarashi Y. Reduction of Fe(III) oxides by phylogenetically and physiologically diverse thermophilic methanogens; *FEMS Microbiol. Ecol.*, 89, 637–645 (2014).

謝辞 本研究は主に東京大学大学院農学生命科学研究科・酵素学研究室にて実施したものです。タンパク質の結晶構造解析を1からお教えくださり、研究の幅を広げる機会を与えていただくとともに、本賞にご推薦くださいました伏信進矢先生に深く感謝致します。LnbXなど数多くの新規酵素を発見され、ご指導受け賜りました京都大学の片山高嶺先生に感謝致します。酵素動力学パラメーターの測定方法を丁寧にお教えくださいました新潟大学の北岡本光先生に感謝致します。DTUのHachem A. M. 先生とJakob P. M. 博士に感謝致します。また日頃より、ディスカッションして下さっている酵素学研究室の荒川孝俊先生、学生の皆様へ感謝致します。放射光施設のKEK-PFおよびSPring-8のスタッフの方々には日頃からお世話になっており、この場をお借りして感謝申し上げます。最後の電気共生に関する研究は博士課程在学中に应用微生物学研究室にて実施しました。嫌気性細菌群集の研究に携わる機会と恵まれた研究環境をお与え下さいました五十嵐泰夫先生に感謝致します。産総研の加藤創一郎博士には論文の書き方など多くのご指導、ご支援いただき大変感謝しております。最後に修士課程で微生物の多様性を解析する手法をお教えくださるとともに、博士課程への進学を勧めていただきました横田明先生に深い感謝の意を表します。