ビフィズス菌のオリゴ糖代謝機構の解明および代謝酵素群の高度利用に関する研究

（独）農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所　主任研究員　西　本　　完

はじめに

腸内細菌の一種であるビフィズス菌は腸内環境を改善するプロバイオティクスとしても利用されており，健康の維持に重要である．乳児期においてはビフィズス菌が寡占状態となるビフィズスフローラが形成され，外部から侵入した病原細菌の腸内での増殖を防止する感染防御などの役割を担うと考えられており，乳児の成育には特に重要とされている．1960年代にビフィズス菌を特異的に増殖させる母乳中の成分の探索が行われ，ヒトミルクオリゴ糖（HMOs）にその活性が見いだされた．HMOs は母乳中の主要糖である乳糖（ラクトース，Galβ1→4Glc）を除く三糖以上のオリゴ糖の総称であり，牛乳にはほとんど含まれていない．なお，牛乳を原料とする人工乳には，現在ラクチュロースやフラクトオリゴ糖などのプレバイオティクスを添加することで人工乳栄養児腸管へのビフィズス菌の定着を促している．HMOs はこれまでに130種類以上もの分子構造が同定されているが，これらのオリゴ糖の大量調製は困難であり，HMOs がビフィズス菌を特異的に増殖させる詳細なメカニズムは不明であった．HMOs の主要成分は2′α フコシルラクトース（Fucα1→2Galβ1→4Glc），ラクト-*N*-テトラオース（Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc），ラクト-*N*-フコペンタオースⅠ（Fucα1,2Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc），ラクト-*N*-ジフコヘキサオースⅠ（Fucα1→2Galβ1→3[Fucα1→4]GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc）などである．このうち2′α フコシルラクトースを除く3分子にはラクト-*N*-ビオースⅠ（Galβ1→3GlcNAc, LNB）構造が含まれており，ヒト特有のオリゴ糖組成である．本講演ではビフィズス菌に特異的なLNB代謝経路の解明およびそれらの代謝酵素を利用したLNB大量調製法の構築について紹介する．

1.　ビフィズス菌のLNB代謝経路

2005年，筆者らはビフィズス菌*Bifidobacterium longum* JCM 1217株よりLNBを加リン酸分解する酵素galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose Ⅰ phosphorylase（EC 2.4.1.211, GLNBP）遺伝子を同定し，大腸菌での遺伝子発現系の構築を行った．GLNBP遺伝子周辺にはLNBの菌体内への取り込みおよび代謝に関与する遺伝子群がオペロン様に存在し（図1），ビフィズス菌特有のエネルギー獲得機構が示唆された．図2に示したように，トランスポーターによって菌体内に取り込まれたLNBはGLNBPによって加リン酸分解され，ガラクトース1リン酸（Gal1*P*）と*N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）となる．Gal1*P*はUDP-グルコース（UDP-Glc）とともにウリジリルトランスフェラーゼ（GalT）によってUDP-ガラクトース（UDP-Gal）とグルコース1リン酸（Glc1*P*）に変換され，Glc1*P*は解糖系で利用される．一方，GlcNAcは新規に同定された*N*-アセチルヘキソサミン1-キナーゼ（NahK）によってリン酸化されて*N*-アセチルグルコサミン1リン酸（GlcNAc1*P*）となり，こちらも解糖系での利用や，GalTによってUDP-GlcNAcにも変換され，アミノ糖代謝系で利用される．このような遺伝子クラスターは他の腸内細菌には見いだされておらず，ビフィズス菌特有のものである．HMOsにはLNB構造が優先的に含まれていること，およびビフィズス菌がLNBの選択的な代謝系酵素を揃えていることから，筆者らは乳児のビフィズスフローラ形成に関して“LNBこそがビフィズス菌の特異的増殖因子である”というLNB仮説を提唱するに至った．すなわち，ビフィズス菌がHMOsからLNBを切り出し，特異的に取り込み，本代謝系により選択的に代謝することで乳児期の腸管内における寡占状態を実現しているという仮説である．なお，一部のビフィズス菌においてはHMOsからLNBの切り出しに必要とされるα-フコシダーゼ，ラクト-*N*-ビオシダーゼといった酵素の菌体外への分泌が確認されている．

2.　実用的なLNB調製法の開発

本仮説を検証するためにはビフィズス菌によるLNBの資化性試験などをする必要がある．しかしながら，LNBは試薬として高価であり，試験に供する大量のLNBを確保するのは現

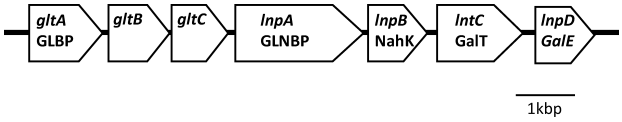

図 1　LNB代謝酵素遺伝子群

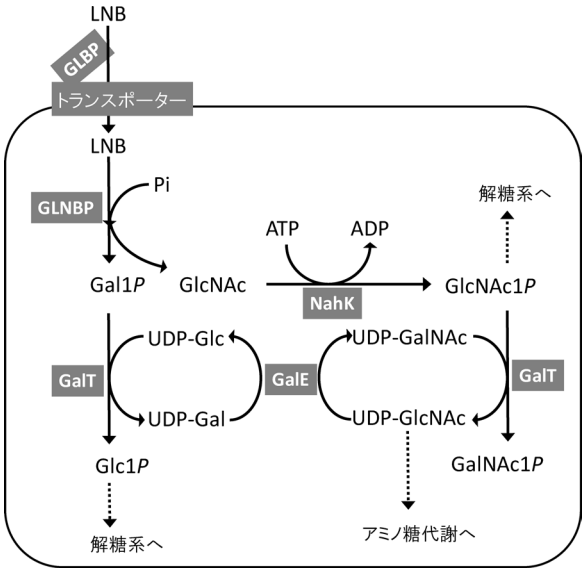

図 2　ビフィズス菌のLNB代謝機構
LNBはGLBPABCトランスポーター系で細胞内に取り込まれた後，4種のLNB代謝酵素によって代謝され，エネルギーの獲得や細胞外多糖の構築に利用される．これにより，乳児腸管内のビフィズス菌の選択的増殖機構が説明可能．

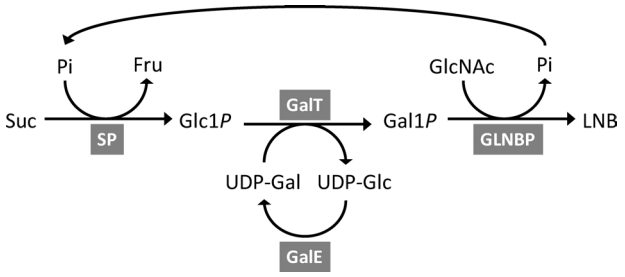

図 3　LNB酵素合成反応スキーム
Suc と GlcNAc を原材料とし，LNB と Fru が生成する．UDP-Glc と Pi は再利用される．

実的に不可能である．そこで筆者らはビフィズス菌の LNB代謝を逆手にとり，安価な原材料から LNB を酵素合成する方法を開発した．それは α グルコシドであるスクロース（Suc）を β ガラクトシドである LNB にワンポットで変換するという方法であり，4種の酵素反応を同時に行うこと，および生成物を再利用することで，Suc と GlcNAc から LNB とフラクトース（Fru）を生成するというシンプルな反応系を構築した．本反応系の概要を図3 に示す．基本的には GLNBP の逆反応を利用して Gal1*P* と GlcNAc から LNB を生成するのだが，Gal1*P* も高価なため，安価な Suc を原材料として 3種の酵素により Gal1*P* を生成する系を組み合わせた．まず，スクロースホスホリラーゼ（SP）が Suc を加リン酸分解し，Glc1*P* と Fru を生成する．この Glc1*P* と UDP-Gal を基質として GalT が Gal1*P* と UDP-Glc に変換する．UDP-Glc はエピメラーゼ（GalE）によって UDP-Gal に再生され，再利用される．生じた Gal1*P* と GlcNAc を基質として GLNBP によって LNB とリン酸が生成し，リン酸（Pi）も SP の反応で再利用される．したがって，Suc および GlcNAc，4種の酵素，触媒量の Pi と UDP-Glc を混合するだけで，ワンポットで LNB が生成，蓄積する仕組みである．実際の反応液における LNB濃度は 0.5 M にまで達し，反応収率は GlcNAc に対して 85％と高収率であった（図4）．また，反応液からの LNB精製法に関しても，スケールアップが容易な結晶化による精製法を開発した．イオン交換樹脂に酵素を吸着させることで酵素を除去した後，ドライイーストを添加して 30℃で一晩培養することで，副生成物である Fru, および未反応の Suc を除去した．この処理液をエバポレーターで濃縮することで LNB を結晶化させ，高純度の LNB標品を調製した．実際には 10 L の反応液より，1.4 kg の LNB標品（純度99％以上）の調製に成功している．

3.　LNB の研究例

大量調製した LNB を用いて各種腸内細菌における資化性試験を行った．その結果，ビフィズス菌以外の細菌ではほとんど資化性が認められなかったが，ビフィズス菌では顕著な資化性が認められた．さらに，ビフィズス菌の中でも特異性が見られ，乳児腸管内に存在する *B. longum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. bifidum*, *B. breve* ではよく資化されるのに対し，成人や動物の腸管に存在する *B. adolescentis*, *B. catenulatum* などでは資化されないことがわかった．このような特異性は GLNBP をはじめとする LNB代謝遺伝子の有無と高い相関があり，LNB が一部のビフィズス菌に対する特異的な増殖促進因子であることが明らかとなった．また，LNB が通常のオリゴ糖では安定な中性域においても熱に不安定であることや，LNB の結晶構造についても明らかとなった．これらの研究も LNB を大量に調製したことで初めて可能となった研究であり，新たなオリゴ糖大量調製法の開発が新たな研究のシーズとなることを示す好例である．さらに，LNB以外にも，基質を GlcNAc から *N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）に変えることで，腸管粘膜糖タンパク質ムチンの糖鎖のコア構造であるガラクト-*N*-ビオース（Galβ1→4GalNAc）や，基質を GlcNAc から L-ラムノース（L-Rha）に変え，別のホスホリラーゼを用いることで，ガラクトシル L-ラムノース（Galβ1→4L-Rha）の酵素合成にも成功している．

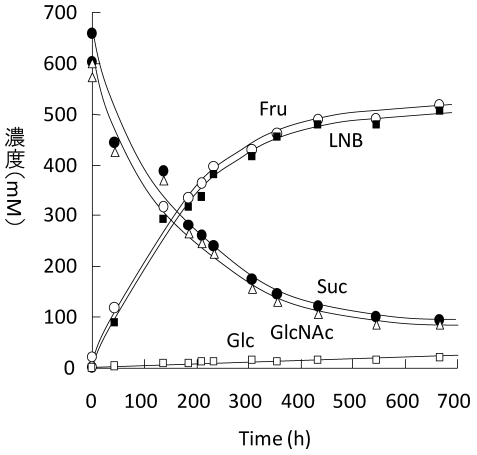

図 4　LNB生成量の経時変化
最終的な LNB濃度は 500 mM，GlcNAc に対する反応収率は 85％．

おわりに

現在，安価に製造できるオリゴ糖の種類が限られていることから，機能性オリゴ糖の市場規模は横ばいもしくは減少傾向にある．本研究で開発した LNB調製法を新たなオリゴ糖調製法の開発への足がかりとし，これまで大量調製できなかったさまざまなオリゴ糖を実用的に製造できるよう，今後も研究を進めていきたい．

謝　辞　本研究は独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所酵素研究ユニットで行われたものです．ポスドク時代からご指導をいただき，本研究を行う機会を与えてくださいました林　清所長，北岡本光ユニット長に深甚なる感謝の意を表します．また，日頃から多大なご協力をいただいている同研究ユニットメンバーの皆様にも併せて感謝の意を表します．学部時代に研究の楽しさを教えていただきました帯広畜産大学　増田宏志先生，大学院時代に糖質関連酵素研究の基礎をたたき込んでくださいました北海道大学　千葉誠哉先生，木村淳夫先生，森　春英先生に心より感謝申し上げます．本研究は石川県立大学　山本憲二先生，片山高嶺先生，近畿大学　芦田　久先生，東京大学　伏信進矢先生をはじめとする多くの研究者のご助言，ご協力なくしてはなしえませんでした．すべての方のお名前を挙げることはできませんが，ここに改めて感謝の意を表します．最後になりましたが，本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関東支部長　星野貴行先生ならびにご支援賜った諸先生方に厚く御礼申し上げます．