



腸内細菌における新規な代謝機能の発見と解析およびその高度利用

石川県立大学生物資源工学研究所 准教授 片山高嶺

はじめに

応用微生物学の発展が微生物の有する多機能性に支えられていることは、誰もが認める事実である。微生物にその多機能性を求めるとき、われわれは、彼らが生息する環境の多様性（極限環境など）を想像しがちであるが、たった一つの環境中においてさえ、そこで生息する微生物は驚くほどの多機能性を備えている。本研究では、腸内という一つの環境中に生息するいくつかの細菌に、これまで知られていなかった新規な代謝機能を発掘するとともに、その経路上の遺伝子やタンパク質の機能解析を行った。さらに、それらを機能改変することで有用物質生産の技術開発を行った。その内容は、「ビフィズス菌とヒトとの共生を支える分子基盤の解明および応用への展開」および「芳香族アミノ酸代謝に関わる機能タンパク質の解析とその高度利用」に分けられる。

1. ビフィズス菌とヒトとの共生を支える分子基盤の解明および応用への展開

ビフィズス菌はヒトの腸管に生息する嫌気性細菌である。本菌は bifid shunt と呼ばれる特異な解糖系を有し、その最終産物として生成される乳酸や酢酸は、腸管内の pH を低下させることで有害菌の増殖を妨げるだけでなく、腸管上皮細胞から取り込まれて宿主のエネルギー源として利用されたり、消化管ホルモンの分泌を制御するシグナル分子としても機能することが知られている。一方、ヒトは腸内を嫌氣的また適度な温度に保つことでビフィズス菌の生育しやすい環境を提供している。ビフィズス菌は小腸下部から大腸に生息しているが、宿主が摂取した糖質成分は宿主自身による消化吸収および消化管上部に生

息する腸内細菌によって消費されてしまうため、本菌の生息する消化管下部には容易に分解しうる糖質成分はほとんど届かない。では、ビフィズス菌はどのようにして栄養源を得ているのであろうか。

以下に述べるように、筆者らはビフィズス菌がヒト自身の分泌する糖質を資化する特異な経路を有していることを見だし、その経路上の酵素について構造機能解析を行うことで、ビフィズス菌とヒトの共生を支える分子基盤の一端を明らかとした。従来、本菌は食餌由来の難分解性オリゴ糖を栄養源としていたと考えられていたが、実はヒト自身が分泌する糖質をも利用して共生を成立させているのである。

1.1 ムチン型糖鎖に作用するグリコシダーゼ

ヒトの腸管はムチンと呼ばれる粘性糖タンパク質に覆われている。そのムチン型糖鎖の非還元末端には α -L-フコシル基が頻繁に見いだされ、ABO 式やルイス式血液型抗原決定基を形成している。筆者らは、ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* より 1,2- α -L-フコシダーゼ (AfcA) および 1,3-1,4- α -L-フコシダーゼ (AfcB) を単離した。また、ムチン型糖鎖のコア 1 構造に作用するエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (EngBF) を *B. longum* より単離した。ビフィズス菌におけるこれらのグリコシダーゼの存在が、ヒトとの共生を考えるきっかけとなった (図 1)。

なお、AfcA と EngBF の遺伝子クローニングは全生物種を通して初めてであり、その詳細な構造機能解析を行った。また、これらの酵素はそれぞれ新規な糖質加水分解酵素ファミリー 95 および 101 として登録された。

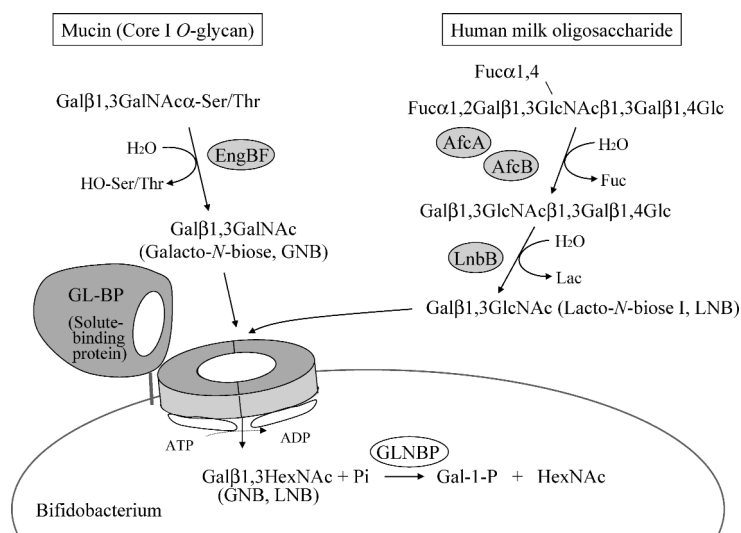


図 1 ヒトとの共生を支えるビフィズス菌の酵素

EngBF, エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ; AfcA, 1,2- α -L-フコシダーゼ; AfcB, 1,3-1,4- α -L-フコシダーゼ; LnbB, ラクト-N-ビオシダーゼ; GL-BP, ガラクト-N-ビオース/ラクト-N-ビオース I 結合タンパク質

1.2 ヒトミルクオリゴ糖への展開—母乳栄養児におけるビフィズスフローラ形成の謎—

上記のグリコシダーゼの発見と時を同じくして、*B. longum* よりガラクト-*N*-ビオース/ラクト-*N*-ビオース I 加リン酸分解酵素 (GLNBP) 遺伝子が単離された。ガラクト-*N*-ビオース (GNB) は、上記のエンド- α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (EngBF) で切り出される二糖構造である。EngBF は菌体外酵素、GLNBP は菌体内酵素であることを考えると、ビフィズス菌には (1) GNB とラクト-*N*-ビオース I (LNB) のトランスポーターが存在すること、および (2) LNB を遊離する菌体外ラクト-*N*-ビオシダーゼが存在することが示唆された。

GNB 構造がムチン型糖鎖に存在するのに対し、LNB 構造は人乳に含まれるラクトース以外のオリゴ糖 (ヒトミルクオリゴ糖) に存在する。種々のビフィズス菌をヒトミルクオリゴ糖のコア構造の一つであるラクト-*N*-テトラオースに作用させると、*B. bifidum* や *B. longum* において LNB の遊離が見られ、ラクト-*N*-ビオシダーゼの存在が明らかとなった。その後、*B. bifidum* より本酵素の遺伝子クローニングを行うとともにその性状解析を行った。また、GLNBP 遺伝子の近傍に存在していた ABC トランスポーターの基質結合タンパク質の構造機能解析を行うことで、このトランスポーターが GNB と LNB の取り込みに関わることを明らかとした。

ここで注目すべきは、ヒトミルクオリゴ糖の代謝に関わるラクト-*N*-ビオシダーゼと GNB/LNB トランスポーターのホモログが、腸内細菌ゲノム中ではビフィズス菌にしか見いだされないことである。母乳栄養児の腸管では、生後速やかにビフィズス菌優勢な腸内細菌叢 (ビフィズスフローラ) が形成されることが知られていたが、その分子基盤は全く明らかとなっていなかった。ヒトミルクオリゴ糖は乳児自身がこれを栄養源とすることができないにもかかわらず乳中に 10~20 g/L 程度と高濃度に含まれること、またビフィズス菌にヒトミルクオリゴ糖を資化する経路が特異的に存在することは、母乳栄養児におけるビフィズスフローラ形成の謎を解く大きな発見であると考

えている。

1.3 ヒトミルクオリゴ糖への展開—フコシルオリゴ糖合成—

ヒトミルクオリゴ糖の多くが、その非還元末端に α 1,2-L-フコシル基を有しており、前述した 1,2- α -L-フコシダーゼ (AfcA) はラクト-*N*-ビオシダーゼとともにヒトミルクオリゴ糖の分解に関わる重要な酵素である。ヒトミルクオリゴ糖にはビフィズス菌増殖因子としての作用以外に、病原菌の腸管への感染阻害作用が報告されており、特にフコシル化されたミルクオリゴ糖が強い活性を示す。そのため効率的な合成法の開発が望まれていた。筆者らは、AfcA の構造をもとに機能改変を行い、本酵素の加水分解活性を消失させたうえで、フッ化フコースとラクトースから立体・位置選択的に 2-フコシルラクトース (ヒトミルクオリゴ糖の最大成分) のみを合成する 1,2- α -L-フコシターゼへと変換することに成功した。これにより、生理活性オリゴ糖の精密酵素合成が可能となった。人工乳をより母乳に近づけることでヒト、特に乳児の健康に資することが目標である。

2. 芳香族アミノ酸代謝に関わる機能タンパク質の解析とその高度利用

腸内においては、しばしばフェノールの遊離が観察されるが、これに関わる酵素がチロシンフェノールリアーゼ (TPL) である。本酵素は一部の腸内細菌属に分布しており、チロシンをピルビン酸、アンモニア、およびフェノールへと加水分解する。この反応は可逆的であり、フェノールをカテコールと置換することにより、パーキンソン病の治療薬として使用される L-ドーパ (3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン) を合成することができる。現在、年間 250 トン程度の L-ドーパが供給されているが、その約 50% は TPL を用いた酵素合成法によって製造されている。本法では TPL 高発現株である腸内細菌属 *Erwinia herbicola* を用いるが、TPL がチロシンによる誘導酵素であるために培養時に多量のチロシンを添加せねばならず、このことが最終産物である L-ドーパの分離精製を困難にしていた。当初、この問題は *tpl* 遺伝子を単離して強力なプロモーター制御下におくことで簡単に回避できると考えられたが、組換え株の生産能は野生型 *E. herbicola* よりも低く、実用化には適さなかった。

筆者らは、*E. herbicola* における TPL のチロシン誘導機構の解明に取り組み、転写調節因子 TyrR を同定するとともにその誘導メカニズムを解明した。すなわち、TyrR は通常二量体を形成しているが、ATP の存在下でチロシンと結合すると六量体へと変化し、*tpl* プロモーターを活性化する。そこで、オリゴマー化能の変化した種々の TyrR 変異体を取得して機能解析を行うとともに、これら改変型 *tyrR* 遺伝子を *E. herbicola* に導入してその L-ドーパ合成能を調べた。その結果、チロシン非誘導時においても、現行株より 30 倍高い生産能を示す組換え株の取得に成功した (図 2)。現在、国内企業において本菌株の実用化が検討されている。また、TPL 発現に関わる因子を探索する過程で新奇な芳香族アミノ酸トランスポーターや取り込み経路を発見し、その生理機能を解明した。

これらの成果は、転写調節因子やトランスポーターなどの機能タンパク質のチューニングを行うことで、目的産物の生産効率を飛躍的に高めるモデルケースとなった。

本研究は、京都大学大学院農学研究科食品工学専攻微生物生

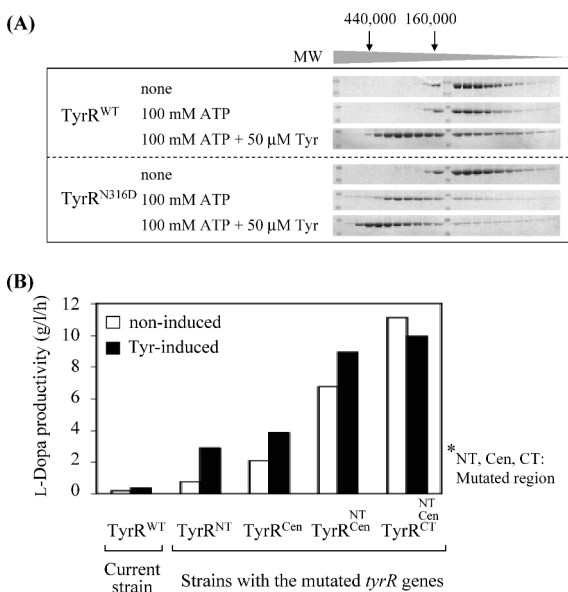


図 2 TPL の転写調節因子 TyrR の機能解析と L-ドーパ生産への利用

(A) 変異型 TyrR の機能解析、(B) 変異型 *tyrR* 遺伝子を導入した組換え *E. herbicola* 菌株の L-ドーパ合成能

産学研究室，同大学院生命科学研究科統合生命科学専攻分子応答機構学研究室，および石川県立大学生物資源工学研究所応用微生物工学研究室において実施したものです。本研究を行う機会を与えてくださり，また自由に研究を遂行することを認めてくださいました恩師・熊谷英彦先生（現 石川県立大学教授）ならびに山本憲二先生（現 石川県立大学客員教授）に心より御礼申し上げます。ピフィズス菌に関する研究の多くは，食品総合研究所の北岡本光先生，京都大学の芦田 久先生，および東京大学の伏信進矢先生との共同研究による成果です。L-ドー

パに関する研究は，鈴木秀之先生（現 京都工芸繊維大学教授）および味の素(株)の横関健三先生（京都大学客員教授）にご指導をいただきました。深く感謝申し上げます。また，これらの研究を遂行するにあたっては，当時，博士研究員であった藤田清貴氏，和田 潤氏，小柳 喬氏，清原正志氏をはじめとする多くの研究室メンバーにご尽力をいただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。最後になりますが，本奨励賞にご推薦くださいました熊谷英彦先生に厚く御礼申し上げます。