

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580179

研究課題名(和文)健康と長寿を指向したアミノ糖含有ヘテロ糖鎖による腸内環境改善技術の開発

研究課題名(英文) Production of aminosugar-containing hetero-oligosaccharides modulating gut microflora that promotes health and longevity

研究代表者

芦田 久 (ASHIDA, Hisashi)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：40379087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ糖を含有するヘテロ2糖であるガラクト-N-ビオース(Gal 1-3GalNAc)は、ヒト腸内の善玉菌の代表的菌種であるビフィズス菌によって特異的に利用されるため、きわめて有望なビフィズス菌増殖因子である。本研究課題では、食品加工中の余剰産物であるチーズホエイおよび胃ムチンを材料として、ビフィズス菌由来のさまざまな酵素を組み合わせることで、ムチン型糖鎖の基部に存在するガラクト-N-ビオースを切り出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Galacto-N-biose, an aminosugar-containing hetero-disaccharides, is one of the most promising bifidogenic factors, which is specifically assimilated by bifidobacteria. We produced galacto-N-biose from mucin-type O-glycans of cheese whey glycomacropeptide and gastric mucin as substrates by using the combination of various glycosidases from bifidobacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌 プレバイオティクス グリコシダーゼ 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

アミノ糖を含有するヘテロ2糖であるガラクト-*N*-ビオース (Galβ1-3GalNAc) やラク ト-*N*-ビオース (Galβ1-3GlcNAc) は、ヒト腸内の善玉菌の代表的菌種であるビフィズス菌によって特異的に菌体内に取り込まれ利用されるため、きわめて有望なビフィズス菌増殖因子である。ガラクト-*N*-ビオースやラク ト-*N*-ビオースは、特異性の高いABCタイプのトランスポーターを経由して菌体内に取り込まれ、やはり特異的なホスホリラーゼによって加リン酸分解されて代謝される。ガラクト-*N*-ビオースやラク ト-*N*-ビオースのβ1,3結合のガラクトースは一般的な細菌のβ-ガラクトシダーゼによって分解されないため、これらのヘテロ2糖はビフィズス菌に選択性の高い増殖因子となることが期待できる。実際に、ラク ト-*N*-ビオースを各種の腸内細菌に与えて培養したところ、半数以上のビフィズス菌株に対して顕著な増殖効果を示したのに対し、狭義の乳酸菌や日和見菌に対しては増殖効果を示さなかった。

2. 研究の目的

ガラクト-*N*-ビオースは自然界では糖タンパク質のムチン型糖鎖の基部に存在している。これまでに、ビフィズス菌からムチン型糖鎖の基部に作用してガラクト-*N*-ビオースを切り出すユニークな酵素であるエンド-α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (EngBF) を見出している。そこで、本研究課題では食品加工中に生じる余剰産物からビフィズス菌由来の酵素を用いてガラクト-*N*-ビオースを取り出すことを目的とした。対象としては、チーズ製造過程で生じるホエイ中のグリコマクロペプチドと、食肉生産・加工過程で生じる胃ムチンを材料として、これらに種々の酵素を作用させることで、ガラクト-*N*-ビオースを効率的に遊離させる方法を検討した。

3. 研究の方法

糖タンパク質のムチン型糖鎖の非還元末端には、難分解性のさまざまな糖鎖抗原が存在している。ムチン型糖鎖の基部からガラクト-*N*-ビオースを切り出すためには、まず末端の糖鎖抗原の除去が必要である。そこで、ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* JCM 1254 のゲノム情報を基に、糖鎖抗原の分解に関与が示唆されるグリコシダーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌で組換え酵素を生産してその諸性質を調べた。最終的に得られた組換え酵素と、ムチン型糖鎖の基部に作用してガラクト-*N*-ビオースを遊離させるエンド-α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (EngBF) を組み合わせることで、ガラクト-*N*-ビオースを遊離させた。ガラクト-*N*-ビオースの遊離は薄層クロマトグラフィーで確認し、定量は順相 HPLC を用いた。

4. 研究成果

(1) 胃ムチンにはさまざまな血液型抗原が付加していることが知られているが、B型物質に作用する GH110 α-ガラクトシダーゼ (AgaBb) をクローニングした。AgaBbにはCBM51ドメインが存在しており、このドメインがB型物質に特異的に結合して、高分子多価の基質への親和性を高める作用があることを明らかにした。すでにクローニングされている GH95 1,2-α-L-フコシダーゼ (AfcA) と組合せることにより、B型とO型物質は分解できることが明らかになった。しかしながら、A型に作用するα-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼは調べた範囲のビフィズス菌には活性が見られなかった。

(2) 胃と十二指腸のムチンに特異的に見られるα-*N*-アセチルグルコサミンキャップ構造はピロリ菌の感染を阻害する生体防御因子であり、難分解性の構造である。この糖鎖に作用する GH89 α-*N*-アセチルグルコサミニダーゼのクローニングにも成功した。

(3) Sd^a抗原は血液型抗原として発見されたが、消化管ムチンにも発現していることが明らかになっており、その構造は分岐した4糖 [GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4GlcNAc-R] である。GH33 α-シアリダーゼドメインと GH123 β-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼドメインの両方をもつユニークな酵素 SiaBb3 をクローニングして Sd^a抗原への作用を調べたところ、ひとつの酵素で Sd^a抗原の末端分岐構造を分解できることが明らかになった。同様の末端構造をもつ GM2 に作用させたところ、ひとつの酵素でラク トシルセラミドにまで分解できた。各ドメインの点変異体酵素を用いて作用機序を調べたところ、まずシアル酸が切断され、次に *N*-アセチルガラクトサミンが遊離することが明らかになった。

(4) 以上の酵素群とエンド-α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ (EngBF) を組み合わせることで、グリコマクロペプチドとブタ胃ムチンから、それぞれ重量の約4%、約6%のガラクト-*N*-ビオースを切り出すことができた。さらに、ビフィズス菌由来の GH20 ラク ト-*N*-ビオシダーゼ (LnbB) を共存させることでブタ胃ムチンから約1%のラク ト-*N*-ビオースも遊離することを明らかにした。

(5) EngBF とわずかな類似性のある未知遺伝子をクローニングしたところ、新奇の基質特異性を有する酵素であった。NagBb と名付けたこの酵素は、GalNAcα1-Ser/Thr によく作用し、小腸や大腸で発現している MUC2 ムチンに多く見られるシアリル-ガラクトシル-コア3型4糖 [Galβ1-3/4GlcNAcβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAc-Ser/Thr] の分解に関与することが示唆

された。NagBb は CAZy データベースにおいて新規の GH129 として登録された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

① α -N-Acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* specifically hydrolyzes α -linked N-acetylglucosamine at nonreducing terminus of O-glycan on gastric mucin. Shimada Y, Watanabe Y, Wakinaka T, Funeno Y, Kubota M, Chaiwangsri T, Kurihara S, Yamamoto K, Katayama T, Ashida H. Appl. Microbiol. Biotech. 99 3941-3948 (2015) [査読有り]
Doi: 10.1007/s00253-014-6201-x

② β -Glucuronidase from *Lactobacillus brevis* useful for baicalin hydrolysis belongs to glycoside hydrolase family 30. Sakurama H, Kishino S, Uchibori Y, Yonejima Y, Ashida H, Kita K, Takahashi S, Ogawa J. Appl. Microbiol. Biotech. 98 4021-4032 (2014) [査読有り]
Doi: 10.1007/s00253-013-5325-8

③ Structural analysis of cerebrosides from *Aspergillus* fungi: the existence of galactosylceramide in *A. oryzae*. Tani Y, Amaishi Y, Funatsu T, Ito M, Itonori S, Hata Y, Ashida H, Yamamoto K. Biotechnol. Lett. 36 2507-2513 (2014) [査読有り]
Doi: 10.1007/s10529-014-1631-1

④ Bifidobacterial α -galactosidase with unique carbohydrate-binding module specifically acts on blood group B antigen. Wakinaka T, Kiyohara M, Kurihara S, Hirata A, Chaiwangsri T, Ohnuma T, Fukamizo T, Katayama T, Ashida H, Yamamoto K. Glycobiology 23 232-240 (2013) [査読有り]
Doi: 10.1093/glycob/cws142

⑤ Crystal structures of a glycoside hydrolase family 20 lacto-N-biosidase from *Bifidobacterium bifidum*. Ito T, Katayama T, Hattie M, Sakurama H, Wada J, Suzuki R, Ashida H, Wakagi T, Yamamoto K, Stubbs KA, Fushinobu S. J. Biol. Chem. 288 11795-11806 (2013) [査読有り]
Doi: 10.1074/jbc.M112.420109

⑥ 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. Sakurama H, Kiyohara M, Wada J, Honda Y, Yamaguchi M, Fukiya S, Yokota A, Ashida H, Kumagai H, Kitaoka M, Yamamoto K, Katayama T. J. Biol. Chem. 288 25194-25206 (2013) [査読有り]
Doi:10.1074/jbc.M113.484733

⑦ Deficiency of α -glucosidase I alters glycoprotein glycosylation and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Katoh T, Takase J, Tani Y, Amamoto R, Aoshima N, Tiemeyer M, Yamamoto K, Ashida H. Glycobiology 23 1142-1151 (2013) [査読有り]
Doi: 10.1093/glycob/cwt051

⑧ α -N-Acetylgalactosaminidase from Infant-associated bifidobacteria belonging to novel glycoside hydrolase family 129 is implicated in alternative mucin degradation pathway. Kiyohara M, Nakatomi T, Kurihara S, Fushinobu S, Suzuki H, Tanaka T, Shoda S, Kitaoka M, Katayama T, Yamamoto K, Ashida H. J. Biol. Chem. 287 693-700 (2012) [査読有り]
Doi: 10.1074/jbc.M111.277384

⑨ A selected probiotic strain of *Lactobacillus fermentum* CM33 isolated from breast-fed infants as a potential source of β -galactosidase for prebiotic oligosaccharide synthesis. Sriphannam W, Lumyong S, Niumsap P, Ashida H, Yamamoto K, Khanongnuch C. J. Microbiol. 50 119-126 (2012) [査読有り]
Doi: 10.1007/s12275-012-1108-7

⑩ *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* uses two different β -galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. Yoshida E, Sakurama H, Kiyohara M, Nakajima M, Kitaoka M, Ashida H, Hirose J, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H. Glycobiology 22 361-368 (2012) [査読有り]
Doi: 10.1093/glycob/cwr116

[学会発表] (計 10 件)

① 芦田 久、鈴木里奈
Sda 抗原を分解するビフィズス菌由来のバイファンクショナル酵素
日本農芸化学会 2015 年度大会 (一般講演 4E32a03)
岡山大学 (岡山県岡山市)
2015 年 3 月 29 日

② 芦田 久

ムチン型糖鎖に作用するグリコシダーゼ ～
土壌微生物から腸内細菌へ～

日本応用糖質科学会 第 39 回近畿支部会・
講演会 (招待講演)

近畿大学会館 (大阪府大阪市)

2014 年 11 月 15 日

③ 芦田 久

ムチンの糖鎖に作用するビフィズス菌の新
奇グリコシダーゼ

食品酵素化学研究会第 14 回学術講演会 (一
般講演 3)

大阪府立大学 (大阪府大阪市)

2014 年 8 月 30 日

④ Takashi Koyanagi, Masashi Kiyohara,
Hiroshi Matsui, Hisashi Ashida, Thida
Chaiwangsri, Toshihiko Katoh, Hisanori Tamaki,
Kenji Yamamoto, Takane Katayama and
Hidehiko Kumagai.

Microbiota analyses on Japanese fermented foods
with 16S rDNA-pyrosequencing approach

OI-1 (Oral presentation)

The 1st Joint Seminar. New Core to Core
Program. A. Advanced Research Networks on
"Establishment of an International Research Core
for New Bio-Research Fields with Microbes from
Tropical Areas"

Bangkok (Thailand)

2014 年 8 月 10-11 日

⑤ Hisashi Ashida, Yoshimi Shimada, Yoshihisa
Funeno, Masayuki Kubota, Thida Chaiwangsri,
Toshihiko Katoh, Takashi Koyanagi, Hisanori
Tamaki, Kenji Yamamoto and Takane Katayama.
Screening and analysis of useful glycosidases for
production of bifidogenic factors

PI-8 (Poster presentation)

The 1st Joint Seminar. New Core to Core
Program. A. Advanced Research Networks on
"Establishment of an International Research Core
for New Bio-Research Fields with Microbes from
Tropical Areas"

Bangkok (Thailand)

2014 年 8 月 10-11 日

⑥ Thida Chaiwangsri, Darunee Namuangrak,
Takashi Koyanagi, Hisashi Ashida and Takane
Katayama.

Isolation of lactic acid bacteria isolated from
fermented foods

PI-9 (Poster presentation)

The 1st Joint Seminar. New Core to Core
Program. A. Advanced Research Networks on
"Establishment of an International Research Core
for New Bio-Research Fields with Microbes from
Tropical Areas"

Bangkok (Thailand)

2014 年 8 月 10-11 日

⑦ 櫻間晴子、清原正志、芦田 久、北岡本
光、高橋里美、山本憲二、片山高嶺

ビフィズス菌由来の新規ラクト-N-ビオシダ
ーゼの同定と機能解析

第 15 回 関西グライコサイエンスフォーラム
(一般講演)

大阪市立大学 (大阪府大阪市)

2014 年 5 月 24 日

⑧ 芦田 久

食品由来オートファジー誘導物質の寿命へ
の効果

第 11 回果実酒・果実飲料と健康に関する研
究会 (招待講演)

近畿大学 (和歌山県紀の川市)

2013 年 12 月 7 日

⑨ 芦田 久

グルコサミンによるオートファジー誘導と
寿命への効果

平成 25 年度 日本応用糖質科学会東日本支部
シンポジウム『適正な生活習慣をサポートす
る糖質機能』(招待講演)

東京大学農学部 (東京都文京区)

2013 年 7 月 25 日

⑩ Hisashi Ashida

Glucosamine as an Autophagy Inducer

13th International Conference of Functional Food
Center (Invited lecture)

京都府立医科大学 (京都府京都市)

2013 年 5 月 12 日

[その他]

ホームページ等

<http://researchmap.jp/ashida/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦田 久 (Ashida, Hisashi)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：40379087

(2) 研究分担者

福澤 秀哉 (Fukuzawa, Hideya)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：30183924

(平成 24～25 年度)