J Life Sci Res 2014; **12**: 25-28
© 2014 Osaka Prefecture University
Journal of Life Science Research
Online ISSN 2186-5809

報　告

ビフィズス菌の糖鎖分解酵素とゲノム

山本　勇[†1]，才新直子[2]

[1]神戸女子大学 家政学部 管理栄養士養成課程，654-8585 神戸市須磨区東須磨青山2-1
[2]神戸女子短期大学 食物栄養学科，650-0046 神戸市中央区港島中町4-7-2

受付：2014年9月17日，受理：2014年10月7日

Polysaccharide degradation enzymes found in genomes of Bifidobacteria

Isamu YAMAMOTO[†1] and Naoko SAISHIN[2]

[1]*Labaortory of Molecular Microbiology, Graduate School of Life Science, Kobe Women's University, 2-1 Higashisuma Aoyama, Suma-ku, Kobe 654-8585, Japan;* [2]*Department of Food Nutrition, Kobe Women's Junior College, 4-7-2 Minatoshima Nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046, Japan.*

Received 17 September 2014; accepted 7 October 2014

Key words : Bifidobacteium（ビフィズス菌）; enzymes for polysaccharide degradation（糖鎖分解酵素）; genome（ゲノム）; probiotics（プロバイオティクス）; prebiotics（プレバイオティクス）; gum arabic（アラビアゴム）

1　はじめに

ヒトの腸内には沢山の種類の細菌が棲んで腸内細菌叢を形成し，腸の蠕動運動の刺激，病原菌の増殖阻止，ビタミンの生産，免疫の活性化などの役割を担っている．腸内細菌の種類と数はDNAの分析技術が進んで培養が困難な菌も検出して定量化できるようになり，現在では1000種類以上，100兆個と考えられるようになった．その中で，ビフィズス菌は腸内細菌叢の主要な構成細菌であり，ヒトや家畜の健康に有益なはたらきをしていることが明らかとなって，プロバイオティクスとしての利用が広がっている．

プロバイオティクスとは，1989年，R. Fullerによって「腸内細菌叢のバランスを改善することによって宿主に有益な効果をもたらす生菌」と定義され[1]，やがてアレルギーやコレステロール代謝の改善，免疫の活性化，発がん予防，抗がん治療に研究が広がって，1998年，GuarnerとSchaafsmaによって「適正な量を摂取したときに宿主に有用な作用を示す生菌」と再定義された[2]．一方，「宿主に有益な作用をもたらす有用菌にのみ選択的に利用される難消化性食品成分」をプレバイオティクスと呼んでいる[3]．プレバイオティクスにはビフィズス菌の増殖を引き起こすオリゴ糖や難消化性の食物繊維などがあり，今後益々その開発が進められていくと予想される．

ゲノムとは個々の生物がもつ全遺伝情報のことであり，プロバイオティクスとして利用されている菌のゲノムの分析が進むことによってプロバイオティクスについての理解が容易になり，関連する遺伝子の様々な分野での利用につながると期待される．ここでは，特に糖鎖の分解に関する性質をゲノムの中に探ってみたい．

2　ビフィズス菌の特徴

ビフィズス菌と通常呼んでいるものは，*Bifidobacterium*属の嫌気性細菌のことで，桿状の両端に枝分かれしたような形を示すほか，次のような特徴をもつ[4]．グラム陽性，芽胞を形成せず，非運動性である．最適増殖温度は37～41 °Cで，25 °C以下や45 °C以上では増殖しない．最適増殖pHは6.5～7.0で，pH 4.5以下，8.5以上では増殖しない．DNAの塩基組成比はG+C含量が57～67 mol %で，これがDNAの増幅に用いるPCR（DNAポリメラーゼ連鎖反応）を困難にする原因になりうる．糖質分解性で，グルコースを分解して酢酸と乳酸を3：2の割合で生成するが，炭酸ガスを生

[†]連絡著者　E-mail: iyamamoto@suma.kobe-wu.ac.jp

編集部注：本稿は，編集部の依頼により，2013年11月22日におこなわれた特別講演の内容を基に執筆されたものである．

成しない．後でも述べるが，種々のオリゴ糖や多糖類を分解して増殖することができることもビフィズス菌の特徴である．

16S rRNA の分析から *Actinobacteria* 綱 *Bifidobacteriaceae* 科に分類されている[5].

ヒト腸内から分離されているビフィズス菌は *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. gallicum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. pseudocatenulatum* の 7 種，2 亜種であり，このうち，特に成人では *B. adolescentis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. pseudocatenulatum* が多く検出され，乳児では *B. longum* subsp. *infantis*, *B. breve* が主である．ヒトにはこれらの菌種の他に口腔に *B. dentium* も見つかっている．

3　ビフィズス菌のゲノム

Bifidobacterium 属のゲノムとして全塩基配列の最初の解析は2002年に, *B. longum* NCC2705 株について報告された[6]. 約 1800 の遺伝子のうち, 糖の代謝や輸送に関連する遺伝子が 1 割を占めることは，ビフィズス菌が大腸で難消化性食物繊維をエネルギー源にしていることと符合している．40 種以上の糖鎖分解酵素, 13種類の ABC トランスポーターが見つかったが, 大腸菌に多く見られる PTS 輸送システムは一つだけであった. これらの糖鎖分解酵素と ABC トランスポーター，遺伝子の転写制御因子の遺伝子が並んだ領域が 7 か所あり，オリゴ糖や多糖類を効率よく利用できるようになっていると考えられる．アミノ酸，核酸の生合成の遺伝子は揃っている. ビタミン B 群のうち葉酸, チアミン, ニコチン酸の合成系はあるが，リボフラビン，ビオチン，コバラミン，パントテン酸，ピリドキシンは合成できない．

ヒトの糞便から単離された *B. longum* DJO10A 株のゲノムは NCC2705 株よりも 120 kbp 大きく，NCC2705 株にない糖鎖加水分解酵素の遺伝子群や抗生物質 (lantibiotics) の合成酵素遺伝子があった[7]．NCC2705 株は乳製品の製造に訓養されているビフィズス菌であり，腸内で他の細菌と栄養の奪い合いを余儀なくされているビフィズス菌とではゲノムに差があるといえる．この他のビフィズス菌種・菌株のゲノムが次々と報告されており，DDBJ, NCBI のデータベースで調べることができる．

ヒトの母乳に含まれているビフィズス菌の増殖を引き起こすビフィズス菌増殖因子が，母乳のオリゴ糖の構成成分となっているラクト *N*-ビオース（ガラクトースが *N*-アセチルグルコサミンと β-1,3 結合した二糖）であり, ラクト *N*-ビオースを分解する酵素ラクト *N*-ビオース/ガラクト *N*-ビオースホスホリラーゼは *B. bifidum* JCM1254 から精製され, *B. longum* subsp. *longum* JCM1217 に遺伝子が同定された[8]. 母乳栄養児の糞便から分離されるビフィズス菌のほとんどがラクト *N*-ビオースで増殖できることが見出されている[9]．母乳のオリゴ糖からラクト *N*-ビオースを遊離する酵素ラクト *N*-ビオシダーゼも上記のビフィズス菌に見つかっている[10]．*O*-結合型ムチン糖タンパク質の糖鎖はガラクト *N*-ビオース（ガラクトースが *N*-アセチルガラクトサミンと β-1,3結合している）を構成成分としており，ガラクト *N*-ビオースもラクト *N*-ビオース/ガラクト *N*-ビオースホスホリラーゼで加リン酸分解される．ムチンから糖鎖を切り出す酵素エンド α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ[11]と α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼの遺伝子も同定され，糖鎖加水分解酵素の新規性が示されている[12].

4　アラビアゴムの構造と関連酵素

アラビノースとガラクトースを主成分とする食物繊維をアラビノガラクタンといい，β-1,4-結合したガラクタンを主鎖とするものを I 型，β-1,3-結合したガラクタンを主鎖とするものを II 型として区別している．I 型アラビノガラクタンのビフィズス菌による分解系の研究は *B. longum* を用いてなされている[13]．アラビアゴムは II 型アラビノガラクタンを含んでおり，食品添加物の安定化剤や錠剤のコーティングなどに使用されており，摂取する機会が多く，ヒト腸内でビフィズス菌の増殖を引き起こすことが知られている[14, 15]．*B. longum* subsp. *longum* と *B. adolescentis* の一部の株がアラビアゴムを炭素源として増殖に利用することが報告されていた[16]が，その分解にはたらく酵素系やその遺伝子に関する研究は無かった. アラビアゴムは, D-ガラクトースが β-1,3-結合した主鎖のガラクタンに D-ガラクトースが β-1,6-結合した側鎖のガラクタンが付いており，その他に L-アラビノース，L-ラムノース，L-フコース，グルクロン酸，4-*O*-メチルグルクロン酸が側鎖に付いている[17]．したがって，β-1,3-ガラクタナーゼ，β-1,6-ガラクタナーゼ，L-アラビノシダーゼ，L-ラムノシダーゼ，L-フコシダーゼ，グルクロニダーゼなどの酵素がアラビアゴムの分解に働いており新規性があると予想された．

5　アラビアゴムで増殖するビフィズス菌

私達はアラビアゴムを炭素源とする増殖能を *B. longum* subsp. *longum* JCM 7052 と JCM 7053 に見出し，JCM 7052 の菌抽出液で 4-ニトロフェニル化した糖を基質にして加水分解酵素活性を測定すると, α-ガラクトシダーゼ, β-ガラクトシダーゼ，β-グルコシダーゼ，α-L-アラビノフラノシダーゼ，α-L-アラビノピラノシダーゼ，α-L-フコピラノシダーゼ

の活性がアラビアゴム培養で高くなることを見出した[18]. 精製したα-ガラクトシダーゼは最適pHが8.0という点で新規な酵素だが，アラビアゴムそのものを分解しなかった. アミノ酸配列は既報の *B. longum* ゲノムには無く，アラビアゴムを分解するJCM 7052株に独特の酵素と考えられる. β-ガラクトシダーゼを精製したところ，ラクトースを加水分解できず，α-L-アラビノピラノシダーゼとα-L-フコピラノシダーゼの活性を示し，アミノ酸配列は *lacA* 遺伝子にコードされていた[19]. 確認していないが，この酵素はβ-1,4ガラクドシド結合は切断せず，β-1,3ガラクトシド結合に特異的な酵素と思われる.

6　アラビアゴム分解性とゲノム

未発表であるが，*B. longum* subsp. *longum* JCM 7052株のゲノムの塩基配列をほぼ読み取っている．未読の領域は挿入配列（insertion sequence, IS）とリボソームRNA領域で，ほぼ同じ配列が数か所にあるためDNAコンティグ間を埋めきれていない．ゲノムの特徴は *B. longum* NCC2705とDJO10Aのゲノムと共通しており，ラクト *N*-ビオース/ガラクト *N*-ビオースホスホリラーゼ，ガラクト *N*-ビオシダーゼもあった．最近，エキソβ-1,3ガラクタナーゼとエンドβ-1,6ガラクタナーゼの遺伝子が *B. longum* JCM 1217に同定され，酵素の性質も詳しく報告された[20]が，これら二つのアラビゴムの分解に必須の遺伝子もJCM 7052にある．一方，JCM 7052には上記のα-ガラクトシダーゼの遺伝子 *agaX* と3個のABCトランスポーター，LacI型転写制御因子，もう一つの糖鎖加水分解酵素の遺伝子クラスターが見つかった．これは *B. adolescentis* L2-32の各遺伝子と高い相同性を示した．更に，リボフラビン合成遺伝子も見つかるなど，既報の *B. longum* ゲノムには見られない塩基配列が見つかっている．現在，*agaX* の遺伝子クラスターとアラビアゴムの分解能との関係を検討しているところである.

7　おわりに

ビフィズス菌の糖鎖分解酵素について母乳のビフィズス菌増殖因子とII型アラビノガラクタン分解系の研究を中心に述べてきた．糖鎖分解では朝鮮人参の薬効成分や大豆のイソフラボンの活性化に関するビフィズス菌のβ-グルコシダーゼ遺伝子について最近の知見が報告された[21,22]. ビフィズス菌のゲノムには同じ活性を持つ酵素が幾つもあるが，菌種によって利用可能な糖類が異なることから，どの遺伝子にコードされた酵素がどんな時に何に作用するのかなど遺伝子発現の条件も異なると思われる.

ビフィズス菌のゲノムに存在する糖鎖分解酵素は50種類以上あるが，機能解明の必要な酵素がまだ残っている. CAZy（http://www.cazy.org/）データや酵素科学，糖鎖科学の情報を絡めて未同定遺伝子の機能を明らかにするとともに，遺伝子の発現制御の研究を通してビフィズス菌のプロバイオティックな効果の要因を探ることが求められている.

次々に出される研究報告に目を通すのが大変な時代になったと感じる日々であるが，2010年頃迄のビフィズス菌やプロバイオティクスに関する研究をまとめたものが，二つの日本の学会と世界の研究者によって出版されている[23,24,25]. 関心のある方にお薦めしたい.

謝辞

寄稿の機会を頂きました大阪府 立大学総合リハビリテーション学部の郁次誠教授に感謝申し上げます.

文献

1 Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol, 66: 365-378.
2 Guarner F, Schaafsma GJ (1998) Probiotics. Int J Food Microbiol, 39: 237-238.
3 Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr, 125: 1401-1412.
4 Scardovi V (1986) Genus *Bifidobacterium* “Bergey’s manual of systematic bacteriology” Vol. 2, (Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, et al. editors), Williams and Wilkins, Baltimore, pp.1418-1434.
5 Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. Int J Syst Bacteriol, 47: 479-491.
6 Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, et al. (2002) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 14422-14427.
7 Lee J-H, Karamychev VN, Kozyavkin SA, et al. (2008) Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. BMC Genomics 9: 247.
8 Kitaoka M, Tian J, Nishimoto M (2005) Novel putative galactose operon involving lacto-*N*-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. Appl Environ Microbiol, 71: 3158-3165.

9 Xiao J Z, Takahashi S, Nishimoto M, et al. (2010) Distribution of in vitro fermentation ability of lacto-*N*-biose I, a major building block of human milk oligosaccharides, in bifidobacterial strains. Appl Environ Microbiol, 76: 54-59.

10 Sakurama H, Kiyohara M, Wada J, et al. (2013) 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.

11 Fujita K, Oura F, Nagamine N, et al. (2005) Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type *O*-glycan-specific endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. J Biol Chem, 280: 37415-37422.

12 Kiyohara M, Nakatomi T, Kurihara S, et al. (2012) α-N-acetylgalactosaminidase from infant-associated bifidobacteria belonging to novel glycoside hydrolase family 129 is implicated in alternative mucin degradation pathway. J Biol Chem, 287: 693-700.

13 Hinz SWA, Pastink MI, van den Broek LAM, et al. (2005) *Bifidobacterium longum* endogalactanase liberates galactotriose from type I galactans. Appl Environ Microbiol, 71: 5501-5510.

14 Cherbut C, Michel C, Raison V, et al. (2003) Acacia gum is a bifidogenic dietary fibre with high digestive tolerance in healthy human. Microb Ecol Health Dis, 15: 43-50.

15 Calame W, Weseler AR, Viebke C, et al. (2008) Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. Br J Nutr, 100: 1269-1275.

16 Crociani F, Alessandrini A, Mucci MM, Biavati B (1994) Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. Int J Food Microbiol, 24: 199-210.

17 Street CA, Anderson DMW (1983) Refinement of the structures previously proposed for gum arabic and other Acacia gum exudates. Talanta 30: 887-893.

18 Saishin N, Yamamoto I (2009) α-Galactosidase purified from *Bifidobacterium longum* JCM 7052 grown on gum arabic. J Biol Macromol, 9: 71-80.

19 Saishin N, Ueta M, Wada A, Yamamoto I (2010) Properties of β-galactosidase purified from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 7052 grown on gum arabic. J Biol Macromol, 10: 23-31.

20 Fujita K, Sakaguchi T, Sakamoto A, et al. (2014) *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* exo-β-1,3-galactanase, an enzyme for the degradation of type II arabinogalactan. Appl Environ Microbiol, 80: 4577-4584.

21 Jung IH, Lee JH, Hyun YJ, Kim DH (2012) Metabolism of ginsenoside Rb1 by human intestinal microflora and cloning of its metabolizing β-D-glucosidase from *Bifidobacterium longum* H-1. Biol Pharm Bull, 35: 573-581.

22 Alegría A, Delgado S, Guadamuro L, et al. (2014) The genome of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* IPLA 36007, a human intestinal strain with isoflavone-activation activity. Gut Pathog. 6: 31.

23 日本乳酸菌学会（2010）“乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス”，京都大学学術出版会，京都.

24 日本ビフィズス菌センター（2011）“腸内共生系のバイオサイエンス”，丸善出版，東京.

25 *Bifidobacteria* genomics and molecular aspects (2010) (Mayo B, van Sinderen D, editors), Caister Academic Press, Norfolk, UK