

腸内細菌による硫酸化ムチン糖鎖の新規分解経路の解明

京都大学大学院 生命科学研究科 加藤 紀彦

【略歴】

2001年3月 京都大学 農学部 生物機能科学科 卒業
2007年9月 京都大学大学院 生命科学研究科 博士後期課程指導認定 退学
2007年11月 米国ジョージア大学 Complex Carbohydrate Research Center ポスドク研究員
2013年10月 石川県立大学 生物資源工学研究所 助教
2015年10月 京都大学大学院 生命科学研究科 助教
2023年5月 京都大学大学院 生命科学研究科 准教授（現在に至る）

はじめに

消化管ムチン糖タンパク質は一般に *O*-結合型糖鎖によって高密度に修飾されたムチンドメインを有する。その糖鎖は病原体との結合・排出に寄与する一方、ムチン資化性菌に分解・代謝され炭素源としても利用される。ムチン糖鎖は様々な残基によって修飾されるがその修飾パターンは腸管部位ごとに違いがある。中でも硫酸基は大腸ムチン（特に遠位大腸）で多く見られる修飾残基である。一般に糖鎖の硫酸化は腸内細菌に対する粘液ムチン層分解への抵抗性を付与すると考えられているものの、一部の腸内細菌は sulfatase 依存的に硫酸化糖鎖の分解をする。一方で、sulfatase を持たないムチン資化性細菌はこれら糖鎖にどのように対処するのか、その分解メカニズムは不明であった。

GH20 スルフォグリコシダーゼ BbhII の同定

我々は、ビフィズス菌 12 種 (13 株) のムチン資化性について検討した。その結果、*Bifidobacterium bifidum* の 2 株がブタ胃ムチンを含む培地で増殖性を示すと同時に、*p*-nitrophenyl 6-sulfated β -*N*-acetylglucosamine (*p*NP- β -GlcNAc-6S) 分解性を呈することを見出した。*B. bifidum* はプロバイオティクスとしても知られるが、ムチン糖鎖を標的とする多種の糖質分解酵素 (glycoside hydrolase: GH) を菌体表層に発現するという特徴を持つ¹⁾。*p*NP- β -GlcNAc-6S の分解機序の検討の結果、sulfatase 非依存的な加水分解であったことから、本菌株が 6 位硫酸化 *N*-acetylglucosamine (GlcNAc-6S) 特異的な sulfoglycosidase (6-sulfo- β -D-*N*-acetylglucosaminidase) を保持する可能性が示唆された。そこで本菌のゲノム解読²⁾と既知 sulfoglycosidase *sgI* 遺伝子との同源性検索の結果、すでに GH20 β -*N*-acetylglucosaminidase として報告されていた *bbhII* が本酵素活性の責任遺伝子である可能性を推定し、精製 BbhII 組み換え酵素を用いた酵素学的諸性質の検討の結果、BbhII は GlcNAc-6S の遊離に高い活性を示す sulfoglycosidase であることを明らかにした³⁾。

BbhII の構造と機能

続いて、BbhII の硫酸化糖鎖認識メカニズムの詳細を明らかにするため BbhII 最小活性保持部位を用いて分解能 1.7 Å で GlcNAc-6S との共結晶の X 線構造解析に成功し、GH20 の触媒ドメインにおける硫酸基認識に関与する残基を特定した。また等温滴定カロリメトリー (ITC) による解析や ELISA によって、BbhII の N 末端側に存在する carbohydrate-binding module 32 (CBM32) ドメインが GlcNAc-6S に特異的に結合することを明らかにした。さらに、本 CBM32 ドメインはムチンに対しての糖遊離活性を向上させる機能を有し、本菌のムチン資化において非常に重要な酵素ドメインであると推定される (後述)。

一方、BbhII 消化処理後のブタ結腸ムチンの MALDI-TOF/MS 分析による糖鎖構造解析の結果、BbhII は core 2 三糖の GlcNAc 残基が硫酸化修飾された構造に作用することを見出した。また新たに合成した BbhII 特異的阻害剤をムチン含有培地に添加して *B. bifidum* を培養すると、同様の構造がム

チン上の残存糖鎖として蓄積することを見出した。さらに、*B. bifidum*を無菌マウス投与したところ、盲腸中単糖遊離量の増加と糞便中の糖鎖量の減少を認めた。*bbhII*株投与では盲腸のGlcNAc-6S遊離は増加せず、さらに重要なことに糞便糖鎖の硫酸化 core 2 構造の有意な蓄積増加を見出した。すなわち本酵素は生体内においてもムチンの同糖鎖構造の分解に重要な役割を果たしている。さらにヒト糞便中のGlcNAc-6Sの遊離量と菌叢の相関性について検討し、乳児サンプルにおいてのみ *bbhII* と GlcNAc-6S 量の正の相関性を観察した。成人サンプルにおいては他菌による GlcNAc-6S のクロスフィードの可能性が示唆された(図1)。本研究によって、*B. bifidum* が持つスルファターゼ非依存的硫酸化糖鎖分解経路の存在を明らかにすることに成功した⁴⁾。

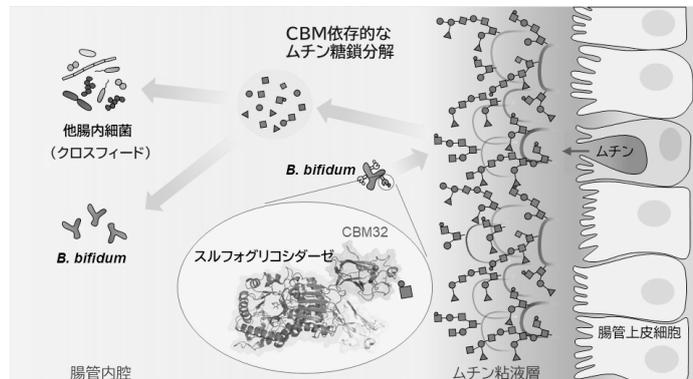


図1、スルフォグリコシダーゼによるムチン分解とクロスフィード

B. bifidum ムチン分解の CBM 依存性

上述のムチンに対する分解活性における CBM ドメインの重要性は、本酵素に限った事象ではない。*B. bifidum* のムチン糖鎖を標的とする既知 GH のほとんどは、GH 触媒ドメインの他に CBM ドメインを有する。より高い分解効率を達成するために、各酵素の CBM ドメインがそれぞれムチン糖鎖リガンドに結合し、ムチン分子を捕捉しつつ加水分解を行うようである。一方で、他のムチン資化性菌に関しては、*B. bifidum* と同じように CBM を多く持つ菌には同じくグラム陽性菌の *Clostridium perfringens* の大部分の株が該当する。しかし *Akkermansia muciniphila* などのグラム陰性菌では保有 GH 数に対する CBM 保持の割合は有意に低い。そこでこれらの菌種間の違いに関して GH 遺伝子保存性を検討した結果、endo-*O*-glycanase をコードする GH16_3 遺伝子の有無が鍵となる可能性を見出した⁴⁾。面白いことに、*B. bifidum* ゲノムには GH16 遺伝子のフラグメント(偽遺伝子)のみが保持され、進化過程で遺伝子の取捨選択が行われたことを示唆している。しかしこれら仮説についてはさらなる検証が必要である。

今後の展望

ムチン糖鎖の硫酸基付加は GlcNAc 以外にもガラクトースやシアル酸についても報告されている。それらの硫酸化糖鎖に関する本菌の分解・代謝経路の解明は今後の課題であり、現在、いくつかの候補遺伝子についての解析を進めている。腸内でのムチン分解のメカニズムとその菌叢・宿主への影響についてさらに理解を深め健康増進へ向けた応用を目指したい。

謝辞

本研究は石川県立大学生物資源工学研究所および京都大学大学院生命科学研究科で行われたものです。ご指導いただいた山本憲二教授、片山高嶺教授をはじめ多くの共同研究者の先生方、また一緒に研究に取り組んでくれた研究員ならびに学生の皆様に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. T. Katoh, *et al.*, *Microorganisms*, **8**, 481. (2020)
2. A. Gotoh, T. Katoh, *et al.*, *Sci. Rep.* **8**(1):13958. (2018)
3. T. Katoh, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**(10):2018-2027. (2017).
4. T. Katoh, *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* doi: 10.1038/s41589-023-01272-y. (2023)