

令和5年6月20日

文部科学記者会、科学記者会、静岡県社会部記者室
山梨県政記者会、府中市政記者クラブ 御中国立大学法人静岡大学
国立大学法人山梨大学
国立大学法人東京農工大学

乳酸菌が作るプレバイオティクス・菌体外多糖を食べる細菌 — 多分岐デキストランを細かく分解してグルコースにする酵素の発見 —

静岡大学グリーン科学技術研究所／農学部の宮崎剛亜准教授の研究グループは、山梨大学大学院総合研究部生命環境学域の舟根和美教授、東京農工大学大学院農学研究院の殿塚隆史教授との共同研究で、乳酸菌が産生する菌体外多糖を分解する酵素の遺伝子を土壤細菌のゲノム情報から発見し、酵素が多糖を分解してエネルギー源となるグルコースに変換する仕組みを明らかにしました。

【研究のポイント】

- 土壤細菌 *Flavobacterium johnsoniae* (フラボバクテリウム・ジョンソニエ) のゲノムから、乳酸菌の菌体外多糖を分解するための酵素の遺伝子を見出しました。
- X線結晶構造解析によって、酵素が菌体外多糖を分解する仕組みを原子・分子レベルで明らかにしました。
- 複数の酵素と糖結合タンパク質が協同して乳酸菌の菌体外多糖を分解し、最終的にグルコースにして取り込むことによってエネルギー源とする一連の仕組みを明らかにしました。

細菌は分解者として他の生物がつくるさまざまな有機物を分解してエネルギー源を得ており、特に糖質を分解する酵素の種類は膨大であります。生息環境に応じて糖質を分解する酵素を有しており、特に腸内細菌などにおいては、動物や植物がつくるオリゴ糖^(*)や多糖^(*)を酵素によって分解してエネルギー源とする仕組みを明らかにした研究が近年増加しています。一方で、細菌はさまざまな種類の菌体外多糖^(*)をつくりますが、他の細菌がそれを分解して利用するといった報告はほとんどありませんでした。本研究では、乳酸菌の一種である *Leuconostoc citreum* (ロイコノストック・シトレウム)^(*)がつくる菌体外多糖である多分岐デキストランを分解するための酵素を、土壤細菌である *Flavobacterium johnsoniae* (フラボバクテリウム・ジョンソニエ)^(*)から発見しました。分解には複数の酵素がかかわっており、その鍵となる酵素が多分岐デキストランを認識して分解する機構を X線結晶構造解析^(*)によって明らかにしました。フラボバクテリウム・ジョンソニエは、菌体外で多分岐デキストランをオリゴ糖に分解して取り込み、さらに単糖のグルコース (ブドウ糖) までに分解する仕組みを持っていることが分かりました。

本研究で見出された酵素の遺伝子は、土壤細菌のみならず一部の腸内細菌にも存在していることが明らかになりました。*Leuconostoc* 属細菌の菌体外多糖はプレバイオティクス^(*)効果があることが報告されており、今後、その分子機構の解明につながると期待されます。

なお、本研究成果は、2023年6月1日に、米国生化学・分子生物学会の発行する国際雑誌「Journal of Biological Chemistry」にオンライン掲載されました。

【研究者コメント】

静岡大学グリーン科学技術研究所 准教授・宮崎 剛重（みやざき たかつぐ）

本研究は、博士課程3年生の中村駿太郎君（創造科学技術大学院自然科学系教育部バイオサイエンス専攻）が、先行研究（ α -1,2-グルコシダーゼの発見）を基に発案したアイデアから発展したもので、微生物の巧みなエネルギー獲得戦略の一端を明らかにすることができました。

【研究背景】

細菌は分解者として他の生物がつくるさまざまな有機物を分解してエネルギーを得ており、その生息環境に応じてさまざまな種類の分解酵素を持っています。特に細菌が有している糖質を分解する酵素の種類は膨大であり、我々ヒトが消化できる多糖である澱粉を分解する酵素（アミラーゼやマルターゼ）だけでなく、セルロースやペクチンといった我々が消化できない食物繊維と呼ばれる多糖を分解できる酵素を持っている種が存在します。近年は、人々の健康に密接に関係することから、特に腸内細菌において、動物や植物がつくるオリゴ糖や多糖を酵素によって分解してエネルギー源とする仕組みを明らかにした研究が増加しています。一方で、細菌自身もさまざまな種類の多糖をつくりますが、他の細菌がそれを分解して利用するといった報告はほとんどありませんでした。

私たちの研究グループは以前行った研究において、希少なオリゴ糖であるコージビオース^(*)の α -1,2-グルコシド結合を特異的に加水分解してグルコースを生成する酵素（FjGH65A）を世界で初めてグラム陰性土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae*（フラボバクテリウム・ジョンソニエ）から発見しました（Nakamura et al. *J. Biol. Chem.* 297, 101366, 2020）。FjGH65A をコードしている遺伝子の近傍には、デキストランを分解する酵素デキストラナーゼ（FjDex31A）や他の推定糖質加水分解酵素、糖分子を認識して捕捉する糖結合タンパク質、オリゴ糖を菌体内に取り込むための輸送体の遺伝子が存在し、オペロン^(*)を形成していると考えられました（図1）。デキストランは一部の乳酸菌が産生する菌体外多糖であり、グルコース（ブドウ糖）が α -1,6-グルコシド結合によって連なった多糖です。乳酸菌の一グループである *Leuconostoc*（ロイコノストック）属細菌は α -1,6結合からなるデキストラン主鎖に、 α -1,2、 α -1,3、 α -1,4結合といった枝分かれ構造をもつ複雑な多糖をつくります。したがって、以前の研究によって見出したフラボバクテリウム・ジョンソニエの酵素・タンパク質の遺伝子群は、*Leuconostoc* 属細菌がつくる菌体外多糖を分解して利用するためのものであると予想されました。そこで私たちは、菌体外多糖を分解する分子メカニズムを明らかにするため、分子生物学、酵素学、構造生物学の実験手法を用いて研究を行いました。

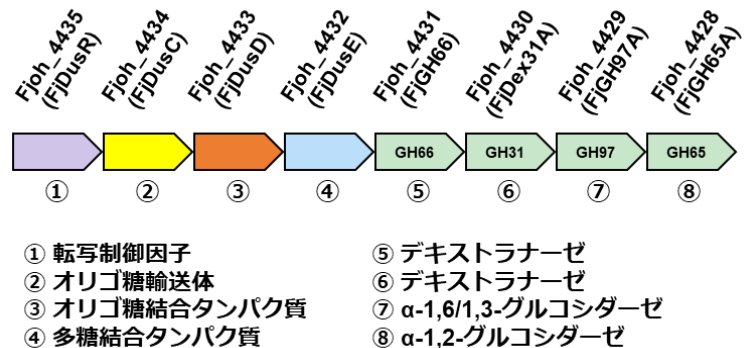


図 1. *Flavobacterium johnsoniae* の多分岐デキストラン分解に関わる酵素・タンパク質の遺伝子群

【研究の成果】

フラボバクテリウム・ジョンソニエをさまざまなオリゴ糖や多糖を含む培地で培養し、FjGH65Aを含む遺伝子群の発現量を調べました。その結果、*Leuconostoc citreum*（ロイコノストック・シトレウム）S-32株が産生する多分岐デキストランを含む培地で培養した時に、これらすべての遺伝子の発現量が顕著に上昇することが明らかになりました（図2）。

既に活性が明らかになっていた FjGH65A や FjDex31A のほか、FjGH66 や FjGH97A の酵素活性を調べたところ、FjGH66 はデキストランをイソマルトオリゴ糖^(*)に分解するデキストラナーゼであり、FjGH97A はイソマルトオリゴ糖の α -1,6結合とニゲロース^(*)の α -1,3結合を加水分解してグルコースにする酵素であることが分かりました。S-32株の多分岐デキストランに対して4種類の酵素を作用させたところ、それぞれ単独で作用させた場合に比べて、生成するグルコースの量が格段に上昇することが分かりました。これは、4種類の酵素が多分岐デキストランの異なる結合を切断することによって別の酵素による分解を促進する相乗効果を示しています（図3）。

さらに、これらの分解酵素の基質認識や分解の分子機構を明らかにするため、X線結晶構造解析を行いました。FjGH66は多分岐デキストランの主鎖構造である α -1,6結合を加水分解するのに適した構造をしており、FjGH65Aは多分岐デキストランがFjGH66によって分解されて生じたオリゴ糖に存在している α -1,2結合を分解するのに適した構造をしていることが明らかになりました(図4)。また、酵素だけではなく2種類の糖結合タンパク質の性質を調べたところ、直鎖のデキストランや多分岐デキストラン、そしてイソマルトオリゴ糖に親和性を示すことが分かりました。

以上の結果から、フラボバクテリウム・ジョンソニエはこれらの分解酵素と糖結合タンパク質を利用して、*Leuconostoc*属の菌体外多糖である多分岐デキストランを分解してグルコースを生成することでエネルギー源を得ている仕組みを明らかにすることができました(図5)。

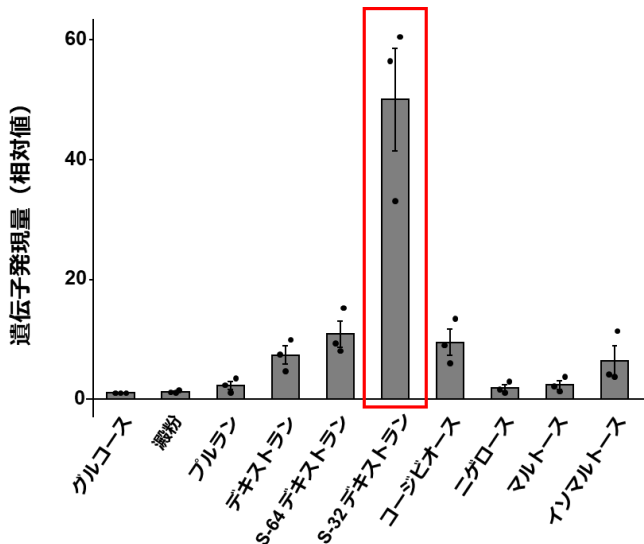


図 2. 各種糖を炭素源として培養した時の FjDusC 遺伝子発現量

S-32株の多分岐デキストランを炭素源として培養したときに顕著に遺伝子発現量が上昇した(赤い枠線)。

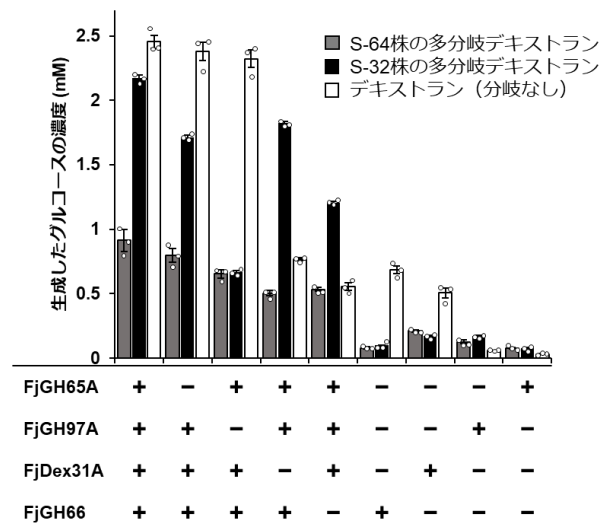


図 3. 多分岐デキストランに4種の加水分解酵素を加えたときのグルコース生成量

+は酵素を加え、-は酵素を加えてないことを示す。

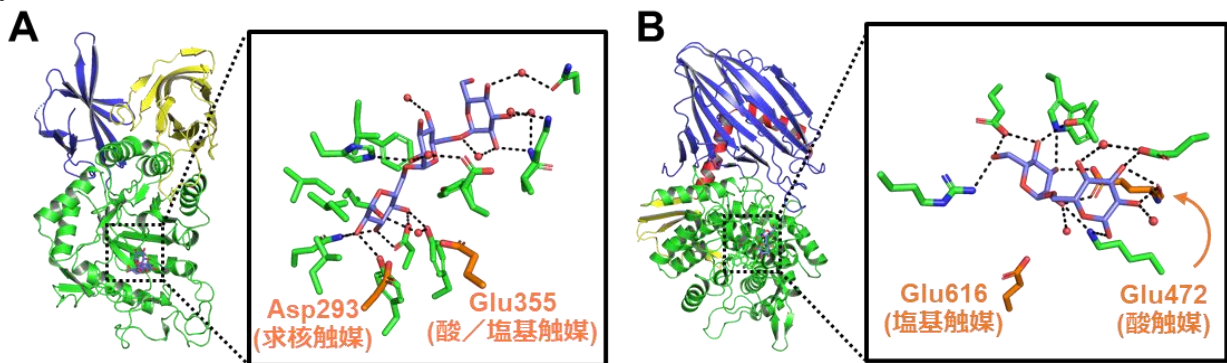


図 4. デキストランを分解するデキストラナーゼ (FjGH66, A) と α -1,2結合の分岐を分解する α -1,2-グルコシダーゼ (FjGH65A, B) の立体構造

それぞれ左が全体構造で、右が基質結合部位を拡大したものである。FjGH66にはイソマルトトリオース(三糖)が、FjGH65Aにはイソマルトース(二糖)が結合している(青色のスティックモデルで表示)。

【今後の展望と波及効果】

細菌は自然界のさまざまなところに生育しており、細菌間で相互作用していますが、まだ明らかになっていない現象が数多くあります。本研究では、土壌細菌の一種が乳酸菌の菌体外多糖を分解して食べているというこれまで知られていなかった細菌間相互作用の一端を明らかにすることができました。これを始まりとして、糖を介したさまざまな細菌間相互作用の分子メカニズムが明らかになることが期待されます。

また、*Leuconostoc* 属などの乳酸菌が産生する菌体外多糖はプレバイオティクス効果が報告されています。本研究で見出した多分岐デキストランを分解する酵素・タンパク質の遺伝子群は一部の腸内細菌にも見られます。したがって、多分岐デキストランを資化することができる腸内細菌を知る指標となり、今後、多分岐デキストランがプレバイオティクス効果を示す分子機構が明らかになることが期待されます。

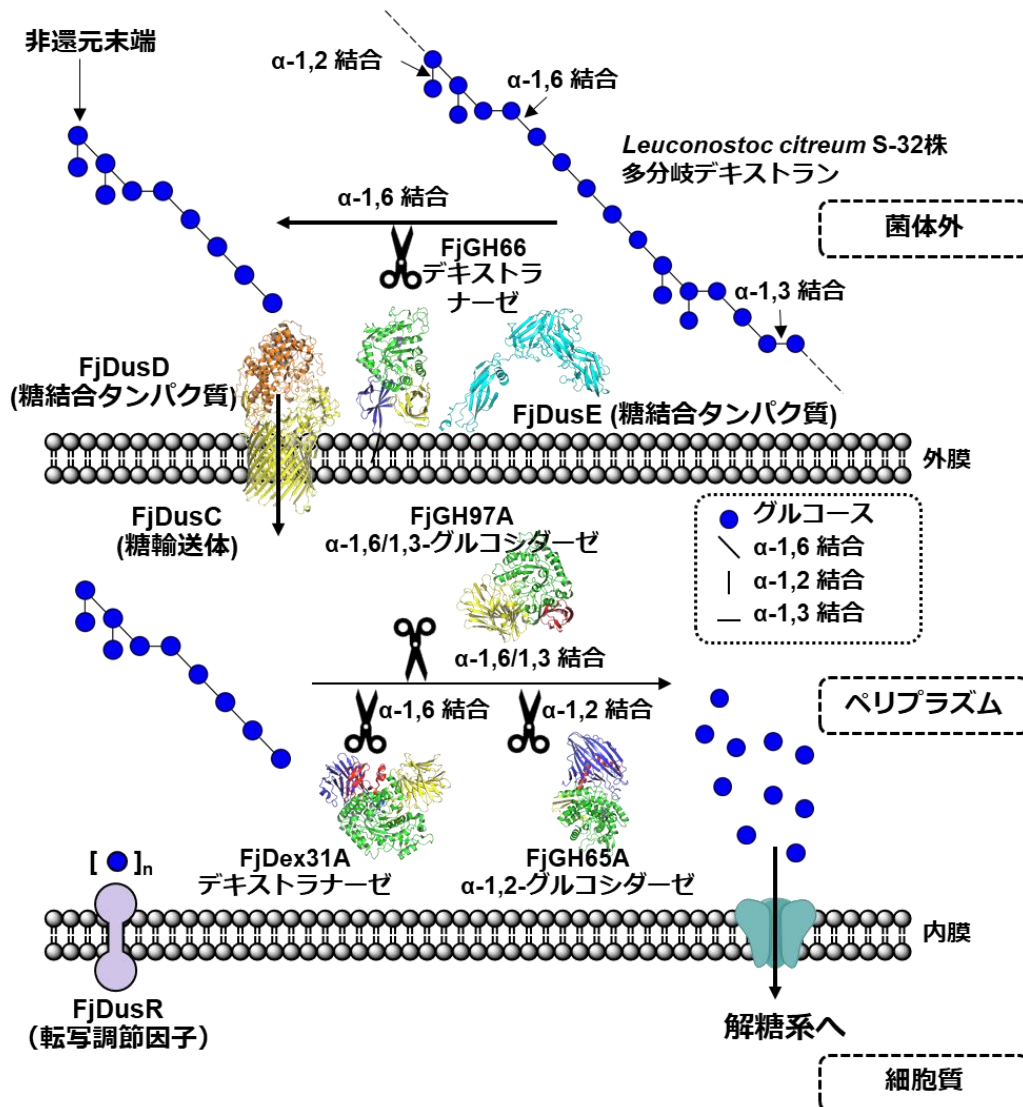


図 5. 本研究で提唱した *Flavobacterium johnsoniae* の多分岐デキストラン分解機構

【論文情報】

掲載誌名: Journal of Biological Chemistry

論文タイトル: Bacteroidota polysaccharide utilization system for branched dextran exopolysaccharides from lactic acid bacteria

著者: Shuntaro Nakamura, Rikuya Kurata, Takashi Tonozuka, Kazumi Funane, Enoch Y. Park, Takatsugu Miyazaki

DOI: 10.1016/j.jbc.2023.104885

【研究助成】

宮崎剛亜

日本学術振興会 科学研究助成事業 若手研究 (19K15748)

日本学術振興会 科学研究助成事業 基盤研究(C) (23K05039)

【用語説明】

1. オリゴ糖

グルコース（ブドウ糖）などの単糖が 2 個～10 個程度結びついた糖の総称。身近なオリゴ糖にはスクロース（ショ糖）やラクトース（乳糖）などがあり、さまざまな機能性がある。

2. 多糖

単糖が 10～20 個以上結びついた糖の総称。構成する単糖や結合様式によってさまざまな構造や性質を示す。グルコースから構成される多糖として澱粉、デキストラン、セルロースなどがあり、すべて結合様式が異なる。

3. 菌体外多糖

細菌や真菌といった微生物が菌体外に産生・分泌する多糖の総称。微生物が宿主などに接着するための因子や微生物自体を保護するバイオフィームとしての機能をもつ。

4. *Leuconostoc* 属

漬物やキムチ、チーズといった発酵食品の生産に利用される細菌種が属する。*Leuconostoc mesenteroides*（ロイコノストック・メセンテロイデス）や *Leuconostoc citreum* が産生する菌体外多糖は、スクロースを原料にグルカンスクラーゼと呼ばれる酵素によって作られ、同種間でも分岐などの構造が多様であることが知られている。*Leuconostoc mesenteroides* の菌体外多糖はプレバイオティクス効果が報告されている。*Leuconostoc citreum* S-32 株は製糖工場から見つかった菌株である。

5. *Flavobacterium johnsoniae*

多糖の一つであるキチンを分解する細菌として土壌から見つかった。ゲノム解析が完了しており、さまざまな多糖を分解する能力や滑走運動する能力に注目した研究がされている。

6. X 線結晶構造解析

タンパク質などの高分子の立体構造を決定するための手法の一つである。結晶に X 線を照射して取得する回折パターンから電子密度情報が得られ、タンパク質の立体構造を原子レベルで解明することができる。

7. プレバイオティクス

大腸内の特定の細菌の増殖を選択的に促進し、宿主に有利な影響を与え、宿主の健康を改善する難消化性食品成分である。

8. コージビオース

グルコースが α -1,2 結合で結ばれてできたオリゴ糖（二糖）。酒やみりんなどから微量に見出される希少なオリゴ糖で、これ自体は非常に高価である。ビフィズス菌増殖効果が報告されている。

9. オペロン

細菌などに広く見られる遺伝子発現を制御する仕組みである。機能的に関連する複数の遺伝子が並んで配置され、単一のプロモーターによって発現が制御される。

10. イソマルトオリゴ糖

グルコースが α -1,6 結合で結ばれてできたオリゴ糖。ビフィズス菌増殖効果があり、食品に利用されている。二糖はイソマルトース、三糖はイソマルトトリオースと呼ばれる。

11. ニゲロース

グルコースが α -1,3 結合で結ばれてできたオリゴ糖（二糖）。酒などから微量に見出される希少なオリゴ糖で、サケビオースという別称もある。

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

静岡大学 グリーン科学技術研究所 生物分子機能研究コア/農学部 応用生命科学科
准教授・宮崎 剛亜 (みやざき たかつぐ)

TEL : 054-238-4886 E-mail : miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp

研究室ウェブサイト : <https://wwp.shizuoka.ac.jp/glycoenzyme/>

山梨大学大学院総合研究部生命環境学域地域食物科学科
教授・舟根 和美 (ふなね かずみ)

TEL : 055-220-8468 E-mail : fkazumi@yamanashi.ac.jp

研究室ウェブサイト : <https://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~fkazumi/>

東京農工大学 大学院農学研究院 応用生命化学部門
教授・殿塚 隆史 (とのづか たかし)

TEL : 042-367-5702 E-mail : tonozuka@cc.tuat.ac.jp

研究室ウェブサイト : <http://web.tuat.ac.jp/~seika/>

(報道に関すること)

静岡大学 総務部 広報・基金課

TEL : 054-238-5179 E-mail : koho_all@adb.shizuoka.ac.jp

山梨大学 総務企画部 総務課 広報企画室

TEL : 055-220-8005, 8006 E-mail : koho@yamanashi.ac.jp

東京農工大学 総務部 企画課 広報係

TEL : 042-367-5930 E-mail : koho2@cc.tuat.ac.jp