

2016年6月28日

乳児ビフィズス菌の共生機構を分子レベルで解明

株式会社ヤクルト本社（社長 根岸 孝成）では、乳児期のビフィズス菌優勢の腸内フローラ形成には、ビフィズス菌の母乳オリゴ糖の主成分であるフコシルラクトース（FL）の利用性が重要であることを明らかにするとともに、その共生機構を分子レベルで解明しました。

なお本研究は、東京工業大学生命理工学院の黒川 顕特任教授（現 国立遺伝学研究所 ゲノム進化研究室教授）ならびに帝京大学医学部小児科学講座の児玉 浩子非常勤講師（前客員教授・現帝京平成大学 健康メディカル学部 健康栄養学科 学科長）との共同研究として実施しました。

本研究では、（１）FL を利用できるビフィズス菌が定着した乳児は、FL を利用できないビフィズス菌が定着している乳児に比べて、便中のビフィズス菌の占有率や酢酸濃度が高く、大腸菌群（Enterobacteriaceae）の占有率やpH が低いこと、（２）ビフィズス菌の FL の利用には菌体内に FL を取り込む FL 輸送体が重要であること、を見出しました。

FL 利用ビフィズス菌の定着によってもたらされる上述の腸内環境の変化は、感染症予防や個体の成長後の生理機能への影響など、宿主に対する有益な作用が多く報告されています。すなわち、母乳中に含まれる FL の存在と一部のビフィズス菌が有する FL 輸送体は、乳児とビフィズス菌が共生関係を構築するための重要な因子であると考えられます。

当社では、世界初のビフィズス菌の直接培養によるはっ酵乳「ミルミル」の発売や、腸内のビフィズス菌を特異的に増殖させるガラクトオリゴ糖の販売を通じて、ヒトの健康と腸内フローラの関連性に着目してきました。

本研究により、乳児の腸内ビフィズス菌の定着機構が明らかとなり、今後、乳児の腸内フローラを標的とした疾病の予防法や新たなプロバイオティクスの開発につながるものと期待されます。

本研究成果は学術誌「Nature Communications」に6月24日に公開されました。

1. 背景

最近の研究により、乳児期の腸内フローラ構成が成長後の個体の生理機能に大きな影響を及ぼすことが明らかとなっています。また、これまでの多くの研究から、乳児ではビフィズス菌優勢の腸内フローラ（ビフィズス・フローラ）が形成されることは明らかになっていますが、乳児期の腸内フローラ形成の法則性やビフィズス・フローラの形成機構は十分に明らかとはなっていませんでした。

そこで、乳児から生後1か月間に提供された糞便サンプルのフローラ構成を調べ、その動的変化と平衡、ならびに代謝産物との関係性を調べることにより、ビフィズス・フローラの形成に影響を及ぼす環境要因とビフィズス菌の特性について解析を行いました。

2. 研究内容

(1) 乳児期の腸内フローラ構成

通常分娩で生まれた12名の母乳により保育される新生児より、生後1か月間糞便を採取し、乳児期の腸内フローラ形成過程を解析しました (図1-a)。

その結果、生後1か月間の腸内フローラは、*Bifidobacteriaceae*、*Enterobacteriaceae*、または *Staphylococcaceae*が優勢の3つのグループに分類できることが、主成分解析によりわかりました (図1-b, c)。また、各グループ間の変遷には法則性があり、*Staphylococcaceae*が優勢のグループから *Enterobacteriaceae*が優勢のグループへ、*Enterobacteriaceae*が優勢のグループから *Bifidobacteriaceae*が優勢のグループへ不可逆的に変化することがわかりました (図1-d)。

(2) 生後1か月目の腸内フローラ構成

上述の12名の新生児に加え、通常分娩で生まれた15名の母乳により保育される新生児より糞便の採集を行い(計27名)、生後1か月目の腸内フローラ構成を調べました。さらにこれら新生児の保護者(成人)22名より糞便の採集を行い、腸内フローラ構成を調べました。

その結果、生後1か月目の腸内フローラ構成は、*Bifidobacteriaceae*が優勢のグループと *Enterobacteriaceae*が優勢の2つのグループに分類できることがわかりました。一方、成人の腸内フローラ構成は、*Lachnospiraceae*、*Clostridiales incertae sedis XIV*、*Bacteroidaceae*、*Ruminococcaceae*および *Peptostreptococcaceae*優勢のグループのみでした(図2-a, b, c)。

(3) 腸内フローラ構成と腸内環境

腸内細菌の定着が腸内環境に及ぼす影響を調べるために、乳児糞便中のpHならびに有機酸の測定を行い、腸内フローラ構成との関係を調べたところ、*Bifidobacteriaceae*の占有率は、糞便の有機酸濃度と正に相関すること、ならびに糞便pHと負に相関することがわかりました (図3-a)。

これまでの研究で、ビフィズス菌は母乳オリゴ糖 (Human Milk Oligosaccharide, HMO) を利用することにより、その代謝産物として酢酸や乳酸を産生させることが報告されていることから、乳児糞便中の残存HMO量の測定を行いました。

その結果、糞便中のHMOの減少と糞便*Bifidobacteriaceae*占有率の増加、有機酸濃度の増加、pHの低下との間には相関関係が見られました (図3-b)。しかし、一部の乳児では、*Bifidobacteriaceae*が存在するにも関わらず、糞便中に高濃度のHMOが残存していることが明らかになりました (図3-c)。そこで、ビフィズス菌のHMOの利用能を調べるために、糞便よりビフィズス菌29株を分離し、HMOを唯一の炭素源とする培地を用いてビフィズス菌の増殖性、ならびにHMOの利用性を調べました。

その結果、図3-d, eに示したとおり、29菌株中14菌株はHMO添加培地で生育しましたが、15菌株は生育できませんでした。培地中の残存オリゴ糖を調べた結果、HMOの主要な構成成分であるFLの利用性は単離したビフィズス菌株により顕著な差があることがわかりました。

(4) ビフィズス菌のゲノムとFL利用性

乳児ビフィズス菌のFL利用性が菌株間で異なる理由を明らかにするために、ビフィズス菌29株のゲノム解析を行いました (表1)。各菌株がもつ遺伝子を詳細に解析したところ、新たに見出され

たABC輸送体（FL輸送体）がFLを利用できる菌株にのみ存在することがわかりました（図4-a）。

さらに、このABC輸送体遺伝子がFL利用性に関わっていることを証明するために、FL輸送体を欠損させたビフィズス菌株を作製し、HMOを含んだ培地での増殖性とFLの消費を調べたところ、FL輸送体欠損ビフィズス菌では増殖が抑制されること、FLが利用されなくなることが確認されました（図4-b、c）。

このことから、今回新たに見いだされたFL輸送体がHMOの主要構成成分であるFL利用の中心的な働きを担っていることがわかりました。

（5）FL利用能を有するビフィズス菌による腸内環境への作用

27名の乳児を、FL輸送用のFL輸送体を保有するFL利用ビフィズス菌株が優勢な乳児、FL非利用ビフィズス菌株が優勢な乳児、ならびにEnterobacteriaceaeが優勢な乳児に群分けし、糞便有機酸、pH、残存HMO量、腸内フローラの比較を行いました（図5）。

その結果、FL利用能を保有するビフィズス菌株が最優勢な乳児の糞便では、他の群の乳児に比べ、糞便中のBifidobacteriaceae占有率が高く、Enterobacteriaceae占有率が低いことが明らかになりました。また、FL利用能を保有するビフィズス菌株が定着した乳児の糞便では、残存のFL濃度が低いこと、酢酸濃度が高くpHが低値を示すことがわかりました。

3. 考察および今後の期待

前述したように、乳児期の腸内フローラ構成が成長後の個体の生理機能に大きな影響を及ぼすことが報告されています。これまでの研究から、多くの乳児の腸管内では、ビフィズス菌が最優勢菌となるビフィズス・フローラが形成されることが明らかになっています。これまでに、HMOの成分ラクト-N-テトラオースが、乳児の腸内でビフィズス菌に選択的に利用されることが明らかとなっていました¹。しかし、HMOの主成分FLのビフィズス菌の菌株間での利用性の違いやその機構は分かっていませんでした。また、乳児ごとに便中のビフィズス菌や大腸菌群（日和見感染菌）の占有率や有機酸濃度などが異なる理由をはじめビフィズス・フローラ形成に至る法則性は十分に明らかとはなっていませんでした。

本解析結果から、乳児期の腸内フローラは、Staphylococcaceae、Enterobacteriaceae、Bifidobacteriaceaeのいずれかが最優勢なフローラが形成されていること、ビフィズス菌優勢の腸内フローラ構成に不可逆的に変化すること、その移行時期は乳児によって異なることが確認されました。また、ビフィズス菌のHMO利用性が、糞便中のビフィズス菌の占有率と酢酸および残存オリゴ糖濃度、pH、大腸菌群占有率に大きな影響を及ぼしていることが明らかになりました。さらにHMOの主要な構成成分であるFLの利用にあたり、新たに見いだされたFL輸送体が重要な役割を果たしていることが分かりました。

新たに同定されたFL輸送体を保有するFL利用性ビフィズス菌株が定着した乳児では、FL利用性ビフィズス菌のHMO資化により、腸内のビフィズス菌占有率が上昇する結果、酢酸など有機酸生成が高まり、腸管内のpHが低下したと考えられます。これらの腸内環境の変化は、宿主によって有益な作用を及ぼすことが数多く報告されています^{2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11}。

したがって、本研究で見いだされたビフィズス菌が保有するFL輸送体は、乳児とビフィズス菌の共生関係を構築するための重要な因子であると考えられます。

これまで乳児期の腸内フローラの形成過程を解析した観察研究は数多く存在しますが、腸内フ

ローラの形成機構に踏み込んだ研究はほとんどありませんでした。本研究は、ビフィズス菌の持つただ一つの遺伝子の有無によって、腸内のフローラ構成と腸内環境が影響を受けていることを、ヒトのコホートで示した最初の報告となります。

4. ヤクルト本社にとっての本研究の意義

ヤクルト本社中央研究所長の石川 文保は、「ヒトの腸内フローラの形成は出生直後から始まり、出生後数日で非常に多くの細菌が腸内に生息するようになります。これまでの新生児の腸内フローラ解析では、多くの新生児を用いた横断的な解析結果が報告されていましたが、特定の被験者を経時的かつ縦断的に解析した報告例、とりわけ有機酸など代謝物の解析、糞便中の残存糖の解析と腸内フローラの変化を組み合わせ考察した研究報告はありませんでした。当社はこれまでに、プレバイオティクス的一种であるガラクトオリゴ糖が殆どの乳児の腸内ビフィズス菌を増やすことを確認してきました。今回の研究により、乳児ではHMOが（選択的に）利用されることでビフィズス菌最優勢のフローラ構成となること、さらにその主成分であるFLの利用に関わる遺伝子とその重要性を明らかにすることができました。以上の事実から、乳児期にビフィズス菌やガラクトオリゴ糖を摂取することでビフィズス菌優勢のバランスのよい腸内フローラを構築できると考えることができます。今後さらに研究を発展させ、ビフィズス・フローラと健康のかかわりについて追究してまいります。」とコメントしています。

以 上

参考文献

1. Wada J, *et al.* *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3996-4004 (2008).
2. Fukuda S, *et al.* Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**, 543-547 (2011).
3. Maslowski KM, *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**, 1282-1286 (2009).
4. Samuel BS, *et al.* Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 16767-16772 (2008).
5. Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **72**, 2240-2247 (2004).
6. Kimura I, *et al.* Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 8030-8035 (2011).
7. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Nunez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* **14**, 685-690 (2013).
8. Stecher B, *et al.* Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. *PLoS Pathog* **6**, e1000711 (2010).
9. Dicksved J, Ellstrom P, Engstrand L, Rautelin H. Susceptibility to *Campylobacter* infection is associated with the species composition of the human fecal microbiota. *MBio* **5**, e01212-e01214 (2014).
10. Dogra S, *et al.* Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *MBio* **6**, e02419-e02414 (2015).
11. Frost G, *et al.* The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun* **5**, 3611 (2013).