

ビフィズス菌によるヒトミルクオリゴ糖代謝の解析

畑 山 恵 美

畜産学研究科畜産衛生学専攻食品衛生学講座（博士前期課程1年）

1. 目 的

母乳栄養児の腸管では、出生後速やかにビフィズス菌が定着し最終的にはほぼビフィズス菌により占められた腸内細菌叢（ビフィズスフローラ）を形成する。母乳中のヒトミルクオリゴ糖は、ビフィズス菌増殖因子として作用すると予想されているが、ビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖代謝経路についてはほとんど明らかにされていない。本研究は、長年謎とされてきた母乳栄養乳児のビフィズスフローラ形成機構を明らかにするため、培地中に唯一の炭素源として添加された母乳由来中性オリゴ糖が、*Bifidobacterium bifidum* JCM1254の培養によってどのような濃度変化を示すか検討した。そのことで人工乳を母乳により近づけるためのオリゴ糖組成を明らかにし、人工栄養乳児の健康に貢献することが目的である。

2. 方 法

母乳からクロロホルム／メタノール抽出によって糖質画分を分離した後、ゲル濾過クロマトグラフィーに供して、ラクトースを除去するとともに酸性オリゴ糖と中性オリゴ糖に分画した。オリゴ糖画分を添加した培地に *Bifidobacterium bifidum* JCM1254菌株を播種し、0, 5, 7.5, 10, 13.5, 19, 25, 31時間培養後、遠心分離により得られた上清を回収し-30℃で保存した。回収したサンプルに内標準物質イソマルトペンタオースを添加し、培養液から回収したオリゴ糖を2-amino benzoic acid で標識化し、Amide-80をカラムとする順相系の高速液体クロマトグラフに供し、各中性ミルクオリゴ糖濃度の経時的な変化を検討した。

3. 結 果

培地中の2'-FL濃度は培養時間5時間までに、LNT,LNFPI濃度は10時間までに減少した。また、LDFT, LNFPII+III, LNDFHI, LNDFHII濃度は培養時間13.5時間までに減少した。3-FL濃度は培養後24時間までに減少した。LNFPII+IIIと3-FLの濃度は培養5時間から10時間の間に一時的な増加が見られた。培養時間31時間までにほとんどのオリゴ糖は培地中から消失した。一方、培養5時間ではラクト-N-ビオース(LNB)が検出され、7.5時間までラクトース(Lac)、グルコース(Glc)と共に濃度増加した後、それらは10時間後には減少した。FucとGalの濃度は培養後31時間まで経時的に増加した。(図1)

4. 考 察

ラクト-N-ビオース (Gal β 1-3GlcNAc, LNB) を含むタイプ I 型オリゴ糖の LNT, LNFPI は、いずれもビフィズス菌による消化が早かった。それらはタイプ 2 型ユニット (Gal β 1-4GlcNAc) を含む LNT や LNFPIII よりも消失時間が速いことからタイプ 1 型オリゴ糖がタイプ 2 型オリゴ糖よりも優先的に代謝される可能性を示した。さらに 2'-FL の急速な消化や LNFPI が LNFPII+III よりも消失時間が速いことが示されたことから、Fuc α 1-2Gal 結合が Fuc α 1-3GlcNAc 結合や Fuc α 1-4GlcNAc 結合よりも優先的に分解されることが示唆された。また 3-FL, LNFPII は培養 10 時間までに濃度の増加が観察された。これはそれぞれ LDFT, LNDFHI の中間代謝生産物が増加したためと考えられる。つまり *B.bifidum* JCM1254 の有する Fuc α 2 フコシダーゼによって LDFT が Fuc と 3-FL に、LNDFHI が Fuc と LNFPII に分解されるため一時的に 3-FL, LNFPII が増加したと推測される。いずれのオリゴ糖も培養 5 時間から 10 時間と早い培養時間で増加していることから Fuc α 2 結合は他の結合よりも切断しやすいと考えられる。また、培地中の単糖の濃度変化においては、Glc がほとんど増加しないのに対し、Fuc, Gal は増え続けることから *B.bifidum* JCM1254 は Fuc, Gal を代謝経路で利用しないか、もしくは利用しにくい可能性が考えられる。

2005 年北岡らは *B.bifidum* JCM1254 がラクト-N-ビオース I による選択的代謝経路を持つことを見出すと共に、ラクト-N-ビオシダーゼ、Fuc α 2 フコシダーゼ、Fuc α 3/ α 4 フコシダーゼ、2 糖トランスポーターなど代謝関連因子の存在を明らかにした。彼らが提唱した LNB 代謝経路仮説 (図 2) によると、LNFPI はフコシダーゼによって Fuc と LNT に分解され、LNT はさらにラクト N ビオシダーゼによって LNB とラクトースに分解される。次いでトランスポーターによって LNB が菌体内に取り込まれ加リン酸分解しながら解糖系アミノ酸代謝系へ移行していく。そのため、今回見られた培地中の LNT と LNFPI の減少や Fuc, LNB, Lac の増加は、tfFuc α 2 フコシダーゼやラクト N ビオシダーゼがタイプ 1 型をもつオリゴ糖に作用したためだと考えられる。一方、タイプ 2 型である LNT もその後分解されていることから、これは上で述べた LNB 代謝経路とは異なり非還元末端より順次加水分解されるタイプ 2 型に対する分解経路が存在することも考えられる。

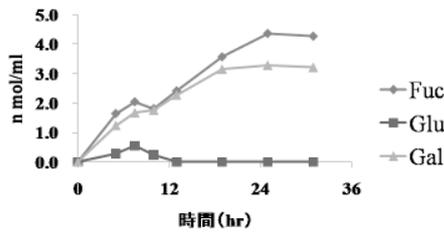
乳児から単離されるビフィズス菌種は今回用いた *B.bifidum* だけではなく *Bifidobacterium infantis*, *B. breve*, *B. longum* など複数の種が単離されている。今後、他菌種でも同様の試験を行い培地中オリゴ糖濃度の変化を明らかにすることで、母乳栄養児のビフィズスフローラ形成機序についての網羅的な解明を目指す。

オリゴ糖の構造式

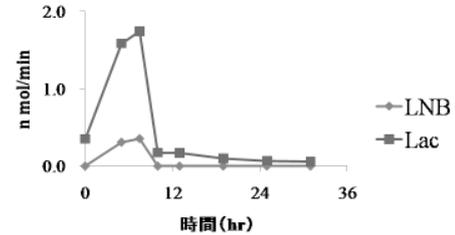
2'-FL	Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc
3-FL	Gal β 1-4[Fuc α 1-3]Glc
LDFT	Fuc α 1-2Gal β 1-4[Fuc α 1-3]Glc
LNB	Gal β 1-3GlcNAc
LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
LNTnT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
LNFPI	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
LNFPII	Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc

LNFP III Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
 LNDFH I Fuc α 1-2Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
 LNDFH II Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]Glc

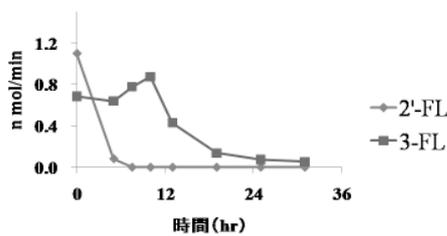
単糖における濃度変化



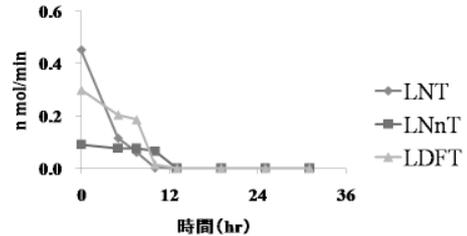
2糖における濃度変化



3糖における濃度変化



4糖における濃度変化



5, 6糖における濃度変化

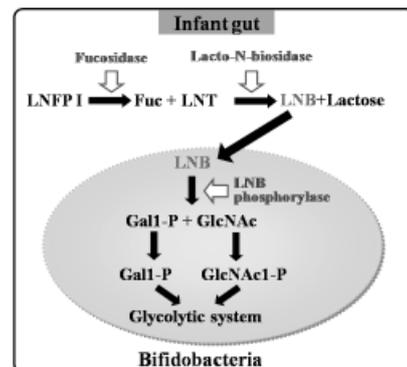
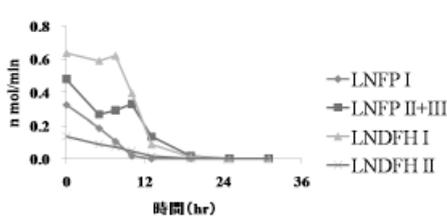


図1 各オリゴ糖の濃度変化

図2 LNB 代謝経路

参考文献

- [1] J.Wada, T.Ando, M.Kiyohara, H.Ashida, M.Kitaoka, M.Yamaguchi, H.Kumagai, T.Katayama, and K.Yamamoto AEM.00149-08(2008)
- [2] H.Ashida, A.Miyake, M.Kiyohara, J.Wada, E. Yoshida, H. Kumagai, T. Katayama and K. Yamamoto Glycobiology 19(9):1010-1017(2009)
- [3] Sela DA, Chapman J, Adeuya A, Kim JH, Chen F, Whitehead TR, Lapidus A, Rokhsar DS, Lebrilla CB, German JB, Price NP, Richardson PM, Mills DA Proc Natl Acad Sci U S A. 105(48):18964-9(2008)

キーワード：ヒトミルクオリゴ糖，ビフィズス菌，代謝