

*Bifidobacterium bifidum*によるムチンO-結合型
糖鎖の分解様式とその生理的意義

高田 紘翠

目次

要旨	2
略語表	4
第一章 緒言	6
第二章 ムチン <i>O</i> -結合型糖鎖の分解に関わる <i>Bifidobacterium bifidum</i> の β - <i>N</i> -acetylglucosaminidases	
背景	11
方法	14
結果	21
考察	46
第三章 総合考察	49
引用文献	53
補足資料	63
謝辞	71

要旨

近年の研究により、腸内細菌およびその代謝物がヒトの健康維持や疾病の発症に大きく関与していることが明らかとなってきた。しかしながら、腸内細菌叢が如何にして形成されるか、また、環境によって菌叢に如何なる変化が生じるかについては未解明な点が多く残されている。腸内細菌叢の形成や構成に影響を与える物質としては、これまで食餌成分に由来する食物繊維に着目した研究が多く報告されてきたが、本研究では、宿主自身が腸管内に分泌発現するムチン糖タンパク質糖鎖(O-結合型糖鎖)に着目し、腸内細菌による O-結合型糖鎖の分解やその分解産物が他の腸内細菌に与える影響を、ムチン資化性細菌の 1 種である *Bifidobacterium bifidum* をモデルとして理解することを試みた。

腸管ムチンの O-結合型糖鎖は、その非還元末端側において様々な修飾を受けるために多様で不均一な構造を有するが、還元末端側は主に 4 種の core 構造 (core 1 – 4) で形成されている。このうち、回腸および結腸由来の糖鎖においては、それぞれ core 4 [GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -O-Ser/Thr] および core 2 [Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -O-Ser/Thr] 構造が特徴的に見られるが、これらの core 構造に特徴的な β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc 結合を切断する酵素が腸内細菌種において未同定であった。そこでデータベース検索等から予測した 2 種の glycoside hydrolase family 84 (GH84) 酵素(BbhIV および BbhV と命名)および、既報の GH20 β -N-acetylglucosaminidase (BbhI) について天然オリゴ糖やブタ胃ムチン(porcine gastric mucin, PGM)を基質としたグライコムクス解析を行い、その機能を解析した。組換え酵素を用いた特異性解析の結果、GH20 BbhI は大腸全体において発現している core 3 構造[GlcNAc β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr]に作用すること、また GH84 BbhIV および BbhV のうち特に BbhIV が core 2 および core 4 構造中の β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc 結合を特異的に切断することが明らかとなった。次に、各遺伝子の単一欠損株および *bbhI* と *bbhIV* の二重欠損株を作製し、PGM 添加培地での増殖能や糖鎖分解能を検証した。その結果、野生株と比較して *bbhIV* 欠損株および *bbhI/bbhIV* 二重欠損株で生育能の低下が観察された。また、培養前後の PGM についてグライコムクス解析を行い各種糖鎖構造の消長を調べたところ、精製酵素を用いた特異性解析の結果から推察された通りの差異が観察された。ムチン糖鎖からの単糖遊離能について調べると、Fuc や Neu5Ac 量では野生株と変異株間で差が見られなかった一方で GlcNAc 量において顕著な違いが観察され、*bbhIV* 欠損株および *bbhI/bbhIV* 二重欠損株ではそれぞれ野生株の半分程度および 1/10 程度にまで減少していた。このことは、BbhI および BbhIV が還元末端側の core 構造だけでなく伸長鎖の N-acetylglucosamine (LacNAc) 構造や β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc 分岐構造の分解にも重要な機能を果たしていることを示唆しており、実際に *bbhI/bbhIV* 二重欠損株で培養後の PGM グライコムクス解析においては他の変異株と比較して長鎖の糖鎖構造が有意に蓄積していた。次に、ムチン糖鎖の分解能を有さない

Bifidobacterium breve を使用した共培養を行ったところ、*B. bifidum* 野生株と比べて *bbhI/bbhIV* 二重欠損株との共培養時では *B. breve* の生育遅延が観察された。以上のことから、*BbhI* および *BbhIV* は、*B. bifidum* のムチン糖鎖利用においてのみならず、細菌間クロスフィーディングにおいても重要な役割を果たすことが明らかとなった。

GH84 酵素は、これまで真核生物におけるシグナル伝達に関わる *O*-GlcNAc 修飾を切断する酵素として認識されていたが、本研究の結果、腸内細菌においてはムチン *O*-結合型糖鎖の分解に関わることが示された。また GH84 酵素が細菌間のみならず細菌-宿主間の水平伝播によって多機能化してきたことが推察された。

略語表

略	正式名称
ACN	Acetonitrile
Amp	Ampicillin
AUC	Area under curve
Cazy	Carbohydrate-Active enZymes
CFU	Colony-forming unit
CBB	Coomassie brilliant blue
CCCP	Carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenyl hydrazone
Cm	Chloramphenicol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FDR	False discovery rate
Fuc	L-Fucose
GAG	Glycosaminoglycans
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamine
GAM	Gifu anaerobic medium
GBL	Galactose-binding-like
GH	Glycoside hydrolase
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamine
GNB	Galacto- <i>N</i> -biose (Gal β 1,3GalNAc)
Hex	Hexose
HexNAc	<i>N</i> -Acetylhexosamine
HPAEC-PAD	High-performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection
HMOs	Human milk oligosaccharides
JCM	The Japan Collection of Microorganisms
Lac	Lactose
LNB	Lacto- <i>N</i> -biose (Gal β 1,3GlcNAc)
LNFP I	Lacto- <i>N</i> -fucopentaose I
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight/mass spectrometry
MRS	de Man Rogosa Sharpe
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminic acid
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate-buffered saline

PGM	Porcine gastric mucin
PI	Precursor ion
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Sp	Spectinomycin
Tet	Tetracycline
<u>TLC</u>	<u>Thin-layer chromatography</u>

第一章 緒言

「腸活」という言葉が誕生したように、乳酸菌またはビフィズス菌などのプロバイオティクス市場規模が拡大し、腸内細菌による健康増進を目指す考えが社会に広く浸透してきた。プロバイオティクスとは、宿主(ヒト)にとって有益な作用をもたらす微生物、あるいは、それらを含む商品のことである。腸内細菌によって健康寿命が延伸するという概念は、1900年に、ヨーグルトを日常的に摂取するブルガリアのスマーリアン地方には80-100歳まで生きる健康長寿者が多いことを発見したIlya Ilyich Mechnikovがヨーグルトによる不老長寿説を提唱したことに始まる。Mechnikovは、腸内における腐敗が自家中毒を起こし、それが死につながると考えた。この「自家中毒説」を発端として、乳酸菌の生理活性および腸内細菌叢の定着やその生理作用について様々な研究が展開されてきた。

腸内細菌は、宿主が摂取した食物や産生する分泌物、あるいは他の細菌の代謝物等を栄養源として増殖し、宿主もまた、腸内細菌の代謝物を利用して、互いに共生関係を築いている。腸内細菌を保有しない無菌マウスと通常マウスを比較した研究から、腸管免疫システムが正常に発達するには腸内細菌が必須なこと(1)、また、腸内細菌が代謝した二次胆汁酸が腸管ROR γ ⁺制御性T細胞の恒常性を調節していることなど(2)、腸内細菌による宿主の免疫制御機構が次々に解明された。さらに、プロピオン酸や酪酸などの腸内細菌代謝物である短鎖脂肪酸は、単に大腸上皮細胞のエネルギー源として利用されるだけでなく、Gタンパク共役受容体(G protein-coupled receptors; GPCRs)を介したシグナル伝達物質として各組織に作用し、宿主のエネルギー代謝調節に重要な役割を果たすなど(3, 4)、腸内細菌は宿主の全身エネルギー代謝に影響を与えることが明らかになった。また、オミクス技術の発展により、ヒトの腸管内には40兆個にも及ぶ細菌が生息して腸内細菌叢と呼ばれる生態系を築き(5)、短鎖脂肪酸以外にも様々な代謝産物を産生していることが明らかとなってきた(6)。このように腸内細菌およびその代謝物が与えるヒト健康への影響が多数報告されるものの、「どのように腸内細菌叢が形成されるか」という重要な課題についての分子基盤には未解明な点が多く残されている。

ヒトの食餌に含まれる単糖および二糖類の多くは小腸で吸収されるため、腸内細菌はヒト消化酵素に耐性を有する食物繊維などの難消化性多糖や、消化管に分泌されるムチン糖タンパク質などを分解して生息しているとされている。デンプン等のように構成糖が単一(glucose: Glc)である難消化性食物繊維の腸内細菌による分解については多くの報告がある一方で、植物細胞壁を構成するarabinogalactanやrhamnogalacturonanなどの多糖類やムチン糖タンパク質の腸内細菌による分解については、その構成糖が複数あること、またそれらの糖同士の結合が多岐にわたり、しかも不均一であることから糖鎖構造解析

が困難であるために、これまで研究はあまり進んでこなかった。また、それらの糖鎖構造を分解する腸内細菌の酵素についても、精密に特異性を解析した例は多くなく、未同定なものも多く残されている。近年、植物細胞壁を構成する多糖類であるarabinogalactan分解酵素についての報告例が増えてきており、ビフィズス菌では*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*のglycoside hydrolase (GH) 39およびGH43がarabinogalactan側鎖に作用し、遊離した分解物が自身または*Bacteroides*属細菌などの他の腸内細菌に利用されることが見出された(7)。このような背景のもと、本研究では、腸内細菌によるムチン糖タンパク質糖鎖の分解に着目した研究を行うことで、宿主由来の糖質を介した腸内細菌叢形成メカニズムの一端を解明することを試みることにした。

一般に、消化管はムチン層に覆われており、その厚さは部位によって大きく異なる。胃では数百 μm ほどの厚さで緩いムチン層、小腸では断片的な薄いムチン層、大腸では1 mm近くの厚さのムチン層が形成されている。ヒトの消化管では約13種類のムチン糖タンパク質が発現しており、それらは分泌型と非分泌型に大別されるが、粘膜表面でゲルを形成しているのは分泌型ムチンとされている。胃では分泌型ムチンMUC5AC [5654 amino acid residues (aa)]とMUC6 (2439 aa)が主に発現し、小腸と大腸では杯細胞から分泌される分泌型ムチンMUC2 (5174 aa)が主成分となっている。なお、膜結合型ムチンは、上皮細胞の表層、特に頂端側に発現しグリコカリックス(糖衣)を形成している。膜結合型ムチンであるMUC17 (4493 aa)は胃から大腸にわたって発現し、小腸および大腸では、MUC3A (3323 aa)、MUC3B (232 aa)、MUC4 (7418 aa)、MUC12 (5335 aa)、MUC13 (512 aa)、およびMUC15 (361 aa)が発現している。また、大腸のみに発現する膜結合型ムチンとして、MUC20 (709 aa)およびMUC21 (566 aa)が挙げられる。

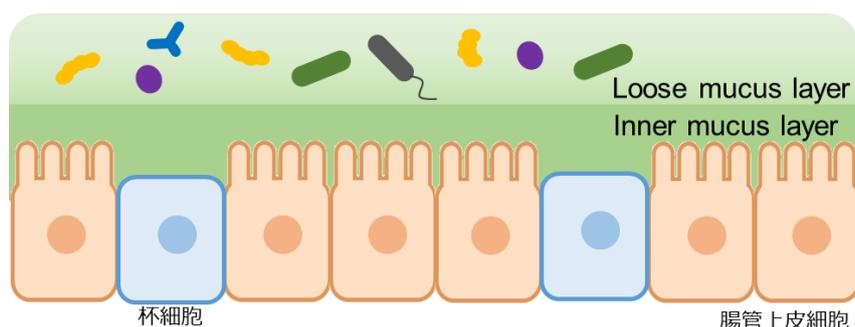


Figure I-1. 大腸のムチン層は2層から成る
腸管上皮細胞はムチン層でおおわれており、大腸では密度が高く菌が入り込めないinner mucus layerと腸内細菌が生息するloose mucus layerに分かれている。どちらも主成分は杯細胞から分泌されるMUC2である。

大腸のムチン層は極めて特徴的な構造を有しており、2つの密度の異なる層(inner mucus layerとloose mucus layer)から形成されている(Figure I-1)。内側のinner mucus layerは、マウスでは約50 μm 、またラットでは100 μm ほどであり、菌が侵入できない高密度な粘膜層である。一方、loose mucus layerはinner mucus layerに比べてその構造は緩く、マウスでは100 μm であることから、その厚さはinner mucus layerのおよそ2倍と推定される。ヒト分泌型ムチンMUC2は、そのペプチド鎖の中央部分にproline/threonine/serin-rich domain (PTSドメイン)と呼ばれる領域が存在している。このPTSドメインのSer/Thr残基に糖鎖修飾が起ることで(O-結合型糖鎖)、水分保持能力が向上するとともに、ムチンに特徴的なゲル構造が構築される(8, 9)。またMUC2には、von Willebrand Cドメイン(C)、4つのvon Willebrand Dドメイン (D1, D2, D3, およびD4)、2つのCysDドメイン、およびC末端側のシステインノット(cysteine knot, CK)ドメインも存在する。糖タンパク質におけるvon Willebrandドメインは、特に血管壁の損傷を止めることによって止血に寄与する例が知られており、その特徴として分泌前に内皮細胞内で長いらせん状の細管に組み立てられることが挙げられるが、この特性は、ゲル構造を形成するムチンの当該ドメインを利用することで獲得されたと考えられている(10)。また、CKは、von Willebrandドメインが多量体を形成し維持するのに必要なドメインとして知られている。

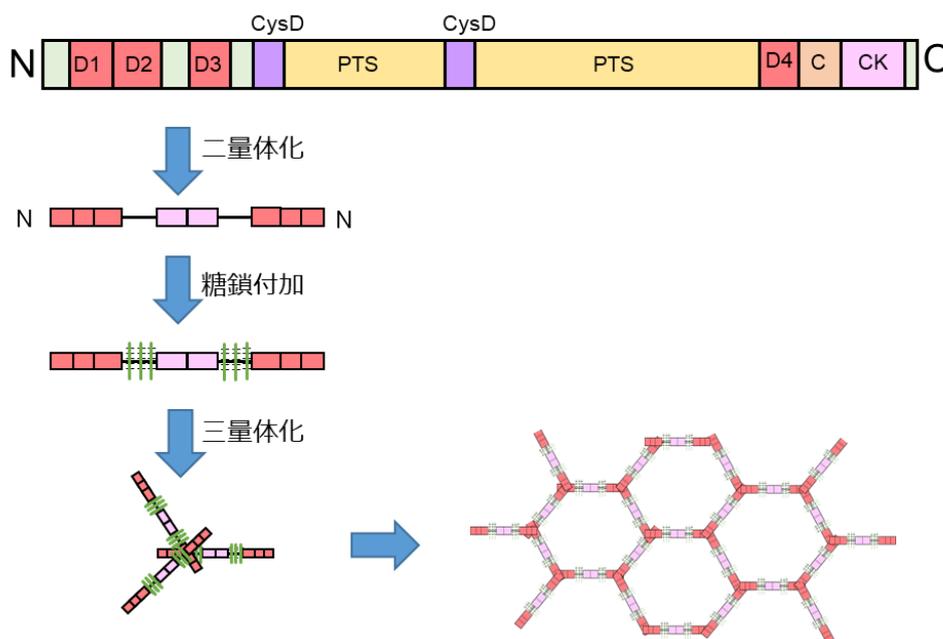


Figure I-2. MUC2のシート構造の形成

MUC2は、2つのPTSドメイン、von Willebrand Cドメイン(C)、von Willebrand Dドメイン(D1, D2, D3, D4)、2つのCysDドメイン、C末端側のCKドメインからなる。C末端側のCKドメイン中のシステイン残基間でジスルフィド結合を形成し二量体となり、ゴルジ体で糖鎖修飾されたのち、N末端側のD3ドメインにて三量体となり、二次元のシート構造を形成する。

小胞体においてMUC2はC末端のCKドメイン中のシステイン間のジスルフィド結合によって二量体を形成し、ゴルジ体にてO-結合型糖鎖が付加され、およそ約5000 kDaの巨大分子となる。さらに、N末端側のD3ドメイン中のシステイン残基のジスルフィド結合によって三量体を形成し、MUC2は二次元のシート構造を示す特徴的なネットワーク構造が形成され、シート構造が積み重なることでムチン層が形成される。また、ムチンO-結合型糖鎖は、ムチン層のゲル形成を維持するために重要な役割も果たす(11-13)。

大腸ムチン層におけるloose mucus layerは、inner layerを形成するMUC2がペプチダーゼによって分解を受けるなどして、糖鎖による水分保持が多くなることによって形作られると考えられているが、2層に分かれるメカニズムは未だ解明されていない。ただし、無菌マウスにもloose mucus layerがあることから、多くの部分は宿主内での作用によって制御されていると考えられている。ムチン層は腸管上皮細胞が直接的に外界の環境と触れることを防ぐ物理的バリアとして機能しており、実際に、MUC2ノックアウトマウスでは腸上皮細胞に細菌が直接接触することで炎症が誘導され、最終的に大腸がんを発症することが知られている(14)。一方、腸内細菌の代謝物である酪酸はムチン発現を促進するなど(15, 16)、腸管内のムチン層の発現には腸内細菌叢も関与する。また、無菌マウスと比較して通常飼育マウスでは、ムチン糖鎖のシアリル化、硫酸化、およびフコシル化等が促進されるなど、腸内細菌によってムチン糖鎖の構造が変化することも報告されている(17)。

さらに、ムチン層中のムチンO-結合型糖鎖は、基本的にその構造が腸上皮細胞上に発現する糖鎖構造と同等であるために、病原体や毒素が腸管上皮に直接付着するのを防ぐ「おとり」としての機能も有している(18, 19)。最近では、ムチンO-結合型糖鎖自体が*Candida albicans*や緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)などの病原微生物の増殖を抑制する可能性があることも示された(20, 21)。ムチンO-結合型糖鎖の重要性は、マウスにおいてムチンcore 1構造(T-抗原：Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr)を合成する酵素のシャペロンである*cosmc*をノックアウトすると、消化管におけるムチン層形成が不完全になり腸内細菌依存的に腸炎を引き起こすことから窺い知ることが出来る(22)。これらのことから、ムチン糖鎖が腸内生態系において腸内細菌叢の制御に重要な役割を果たしていることが分かる。しかしその一方で、上述した通りムチンO-結合型糖鎖は腸内細菌の栄養源としての役割も有しており(23, 24)、例えばムチンO-結合型糖鎖の分解に関わるとされる遺伝子(転写因子)を欠損させた*Bacteroides thetaiotaomicron*では、マウス腸管内における定着能が低下することが知られている(25)。またDesaiらは、食物繊維を含まない飼料を与えたマウスの腸内においては、ムチンO-結合型糖鎖分解に関わる細菌の割合が増え、さらに、ムチンO-結合型糖鎖を分解すると推定される腸内細菌遺伝子の発現が上昇することを報告している(26)。このように、ムチンは宿主と腸内細菌の直接的な境界を形成する分子として機能することに加え、腸内細菌の定着の場ともなり、両者の相互作用を

仲介する意味で極めて重要な共生因子であると言える(24, 27)。

従って、腸内細菌がムチンO-結合型糖鎖をどのように分解するかを理解することは、腸内細菌叢の形成と維持に関する機能的考察を得る上で極めて重要であり、また最終的には宿主であるヒトの健康や疾病に関わる課題と言える(28)。すなわち、腸内細菌叢の形成メカニズムを解明するためには、ひとつひとつの細菌に着目し、その細菌がどのような酵素を利用して、どのように腸管内で生息しているのかという生存戦略を詳細に理解することが不可欠である。

第二章 ムチンO-結合型糖鎖の分解に関わる *Bifidobacterium bifidum* の β -N-acetylglucosaminidases

背景

哺乳類の消化管は、腸管上皮細胞から分泌されるムチン糖タンパク質を主成分とする粘液層で覆われている(29, 30)。特に大腸を覆うムチン層は1 mmの厚さにも達し、O-結合型糖鎖が高密度で付加している。これらは、病原性菌の定着を防ぎつつ、一部のムチン資化能を有する腸内細菌にエネルギー源として提供され、定着の場として機能する。

ムチンに結合した糖鎖は、その殆どがN-acetylgalactosamine (GalNAc)がSer/Thrの側鎖のOH基に α 結合した基本骨格を有するO-結合型糖鎖(O-GalNAc glycans)であり、GalNAc以外ではgalactose (Gal)、N-acetylglucosamine (GlcNAc)、fucose (Fuc)、およびN-acetylneuraminic acid (Neu5Ac)が基本的な構成糖である。消化管で発現しているムチンO-結合型糖鎖は、主にcore 1構造 [Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr]、core 2構造 [Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -O-Ser/Thr]、core 3構造(GlcNAc β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr)、core 4構造[GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -O-Ser/Thr]と呼ばれる4種のcore構造を基本骨格とする(Figure II-1)。これらのcore構造に続いて、LacNAc構造(Gal β 1-4GlcNAc)やlacto-N-biose I (LNB)構造(Gal β 1-3GlcNAc)などが付加し、糖鎖伸長が起こる。また、それらにNeu5AcやFucが付加してH抗原、Lewis抗原、またSd^a抗原と呼ばれる糖構造を持つことや血液型抗原が提示されることもあり、ムチンO-結合型糖鎖の構造は多様である。そのうち、core 1構造を有する糖鎖は胃に、core 3構造を有する糖鎖は大腸ムチン全体に、core 2構造およびcore 4構造を有する糖鎖はそれぞれ結腸や回腸において特徴的に発現している(31)。

*Bifidobacterium bifidum*は様々な哺乳動物の腸内に生息しているが(32)、これは本菌が有するムチンO-結合型糖鎖の分解能に起因していると考えられる。すなわち、*B. bifidum*はムチンO-結合型糖鎖の分解に必要な一連の細胞壁アンカー型の糖質分解酵素(GHs)を持っており(Figure II-2) (33)、これまでにH抗原に特異的な1,2- α -L-fucosidase (34, 35)、Lewis抗原に特異的な1,3/4- α -L-fucosidase (36, 37)、2種類のsialidase (38, 39)、I型糖鎖(Gal β 1-3GlcNAc β -O-R)特異的なlacto-N-bioseidase (40, 41)、 β -1,4-galactosidase (42)、 β -1,3-N-acetylglucosaminidase (42)、6-O-sulfo- β -N-acetylglucosamine (GlcNAc6S)を遊離する sulfoglycosidase (43, 44)、血液型B型物質に特異的な α -galactosidase (45)、および胃ムチン糖鎖の非還元末端に特徴的に見られる GlcNAc α 1-4Gal 構造特異的な α -N-acetylglucosaminidase (46)などが同定されている。また、T抗原からgalacto-N-biose (Gal β 1-

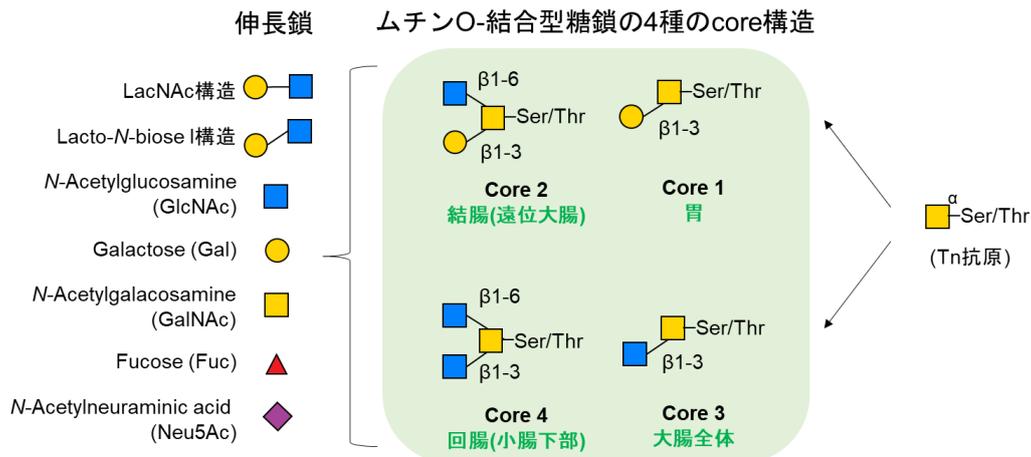


Figure II-1. 腸管内に見られるムチンO-結合型糖鎖の4種のcore構造と鎖伸長糖シンボルは、The Nomenclature Committee of the Consortium for Functional Glycomicsに従った(47)。

3GalNAc)を遊離するendo- α -*N*-acetylgalactosaminidaseのホモログが存在することも報告されている(48)。

これらのGHの特異性は、ブタ胃ムチン(porcine gastric mucin : PGM)を炭素源として*B. bifidum*を培養し、そのO-結合型糖鎖の網羅的解析を行った際に得られる結果とよく符号している(33)。しかしながら、依然としてムチン糖鎖の分解経路において未同定な酵素が存在しており、上述した大腸ムチンに見られるcore 2構造[Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-O-Ser/Thr]およびcore 4構造[GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-O-Ser/Thr]で見られる β -(1 \rightarrow 6)-結合を分解する β -*N*-acetylglucosaminidase (s)については不明なままであった。

一般に、 β -(1 \rightarrow 6)-結合に作用する微生物由来 β -*N*-acetylglucosaminidaseについては情報が不足しているが、Pluvinageらは*Clostridium perfringens*の4種の酵素がムチンcore 2構造からGlcNAcを遊離可能であることを薄層クロマトグラフィー解析(thin-layer chromatography : TLC)により示している(49)。また、Garridoらは*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*のGH20酵素 β -*N*-acetylglucosaminidase (Blon_0732)がヒトミルクオリゴ糖(human milk oligosaccharides : HMOs)中の β -(1 \rightarrow 3)-および β -(1 \rightarrow 6)-結合の両方に作用することを同じくTLC解析によって示している(50)。ただし、いずれの場合もオリゴ糖を基質としており、糖タンパク質糖鎖に対する活性については解析されていない。また定性的な解析結果であるために、その生理的意義についても不明なままである。このような背景から、本章では*B. bifidum*をモデルとしてムチンO-結合型糖鎖のcore 2およびcore 4構造に作用する β -*N*-acetylglucosaminidaseの同定と解析を行うこととした。その結果、 β -(1 \rightarrow 6)-結合に特異的な酵素としてGH84に属する β -*N*-acetylglucosaminidaseを同定した。GH84酵素は、これまで真核生物においてタンパク質O-GlcNAc修飾に作用する酵素とし

て認識されていたが(51, 52)、腸内細菌のうち少なくとも*B. bifidum*においてはムチン糖鎖分解に関わっていることが明らかとなった。

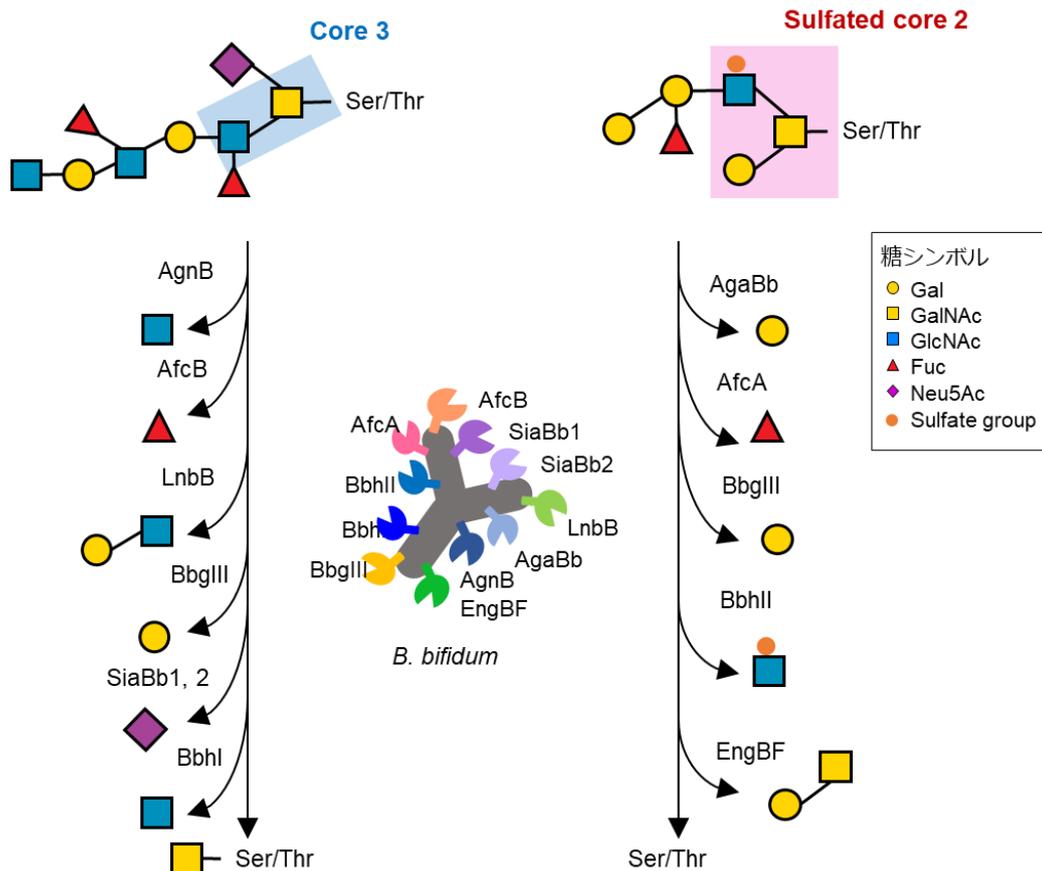


Figure II-2. *B. bifidum*によるムチンO-結合型糖鎖の分解様式
Core 3構造およびcore 2構造を持つO-結合型糖鎖の分解過程に関わる酵素を示す。Core 2構造のβ-1,6-GlcNAcの6位が硫酸化されている場合(6-O-sulfo-GlcNAc)では、BbhIIが作用することでGlcNAc-6Sが遊離するが、硫酸化されていない場合に作用するGlcNAc-aseは同定されていない。糖シンボルは、The Nomenclature Committee of the Consortium for Functional Glycomicsに従った(47)。

方法

試薬類

Lacto-*N*-fucopentaose I (Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, LNFP I) および GlcNAc β 1-*O*-Serは、Carbosynth Ltd. (Compton, UK)より購入した。*p*-Nitrophenyl β -Glc (Glc-*p*NP) および*p*NP- β -GlcNAc (GlcNAc-*p*NP)はNacalai Tesque (Kyoto, Japan)より入手した。core 2-*p*NP [Gal β 1-3 (GlcNAc β 1-6) GalNAc α 1-*p*NP]はToronto Research Chemicals (North York, Canada)より購入した。*N,N'*-Diacetylchitobiose (GlcNAc β 1-4GlcNAc)、core 2-Thr [Gal β 1-3 (GlcNAc β 1-6) GalNAc α 1-*O*-Thr]、core 3-Thr [GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-*O*-Thr]、およびcore 4-Thr [GlcNAc β 1-3 (GlcNAc β 1-6) GalNAc α 1-*O*-Thr]はTokyo Chemical Industry Co. Ltd. (Tokyo, Japan)より購入した。*p*NP- β -Gal、*p*NP- β -GalNAc、およびGlcNAc β 1-2ManはSigma-Aldrich (St. Louis, MO)より購入した。Lacto-*N*-triose II (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc)は、木村早希氏(分子応答機構学分野所属修士課程学生)が、lacto-*N*-neotetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, LNnT)から*Aspergillus oryzae* β -galactosidase (Sigma-Aldrich)を用いてGalを除去し、Toyoparl HW-40C gel chromatography (20 mm \times 600 mm) (Tosoh Corp, Tokyo, Japan)にて精製したものをを用いた。

本研究において、一般試薬は特級のものを使用した。なお、糖鎖分析の際には高速液体クロマトグラフ用あるいはLC-MS用特級試薬を用いた。その他の試薬は下記方法中に記載したものをを使用した。

菌株とその培養方法

B. bifidum JCM 1254、*B. bifidum* JCM 7004および*Bifidobacterium breve* JCM 1192は、理化学研究所微生物材料開発室より入手した。また、乳児糞便から単離された*B. bifidum* TMC3108およびTMC3115も形質転換効率を調べる際に用いた(53, 54)。ビフィズス菌はGifu Anaerobic Medium (GAM培地、Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan)を用いて、アネロパック・ケンキ (Mitsubishi Gas Chemical Co., Tokyo, Japan)によって酸素を炭酸ガスに置換した嫌気条件下、または嫌気チャンバー(InvivoO₂ 400, Ruskinn Technology Ltd, Bridgend, UK, ガス組成; 10 % CO₂, 5 % H₂, 85 % N₂)内にて37 °Cで培養した。

ムチン*O*-結合型糖鎖に対する*B. bifidum*の分解能解析には、0.34 % (w/v) L-ascorbic acid と0.02 % (w/v) L-cysteine hydrochlorideを含むmodified de Man-Rogosa-Sharpe (mMRS)培地を用いた。ムチン*O*-結合型糖鎖構成単糖の混合液[Fuc, Gal, GalNAc, GlcNAc, Neu5Ac, 各0.2% (w/v)]は、*B. breve*の単糖資化能を調べる際の糖源として用いた。

プラスミド作製のために用いた*Escherichia coli* DH5 α (Toyobo)は、Luria-Bertani (LB)培地にて37 °Cで培養した。また、必要に応じて以下の濃度にて抗生物質を添加した[Chloramphenicol (Cm, ビフィズス菌には2.5 μ g/mL、大腸菌には5 μ g/mL)、spectinomycin (Sp、ビフィズス菌には30 μ g/mL、大腸菌には60 μ g/mL)、tetracycline (Tet、両菌とも5 μ g/mL)、ampicillin (Amp、大腸菌に100 μ g/mL)]。

菌の増殖は、600 nmの光学密度(OD₆₀₀)、またはGAM寒天培地上でのcolony-forming unit (CFU)を測定することにより観察した。曲線下面積 (area under curve : AUC) は、Microsoft Excel (Microsoft Corporation)を用いて算出した。特記しないかぎり実験反復は $n = 3$ で行い、結果は平均 ± 標準偏差(SD)で示した。

逆転写定量PCR (Reverse transcription quantitative PCR: RT-qPCR) による遺伝子発現量解析

GAM液体培地にて一晚培養した*B. bifidum* JCM 1254を0.5 % PGMまたはLactose (Lac)を含むmMRS培地にOD₆₀₀値が0.01となるように植菌した。嫌気条件下で37 °Cにて培養し、対数増殖期(OD₆₀₀値が0.4 - 0.6)および定常期(OD₆₀₀値が1.0 - 1.3)にサンプリングして、ただちにPBSで洗浄した後、200 µLのRNAlater (Thermo fisher scientific)を添加して抽出を行うまで4 °Cで保存した。

回収した菌体はステンレスビーズ一粒($\phi = 5$ mm)および約200 mgのジルコニアビーズ、および下記キットに含まれるRA-1 bufferを入れたチューブ内に移し、ShakeMaster Neo (Bio Medical Science, Tokyo, Japan)を使用して1500 rpmにて10分間振盪させることで破碎した。Total RNAの抽出は、NucleoSpin® RNA kit (TaKaRa Bio Inc. Inc., Shiga, Japan)を用いて行った。抽出したtotal RNAについて再度DNase I処理を行った後、カラム精製を行った。cDNA合成にはRT with PrimeScript™ II 1st strand cDNA synthesis kit (TaKaRa Bio Inc.)を用い、500 ngのtotal RNAを鋳型として使用した。定量PCRにはTB Green® system (TaKaRa Bio Inc.)を用い、プログラム[95 °C, 30秒→(95 °C, 5秒→60 °C, 30秒)×40サイクル]にて行った。なお、レファレンス遺伝子としては*uvrD*を使用した(55)。使用したプライマーはSupplementary Table S1に示す。増幅特異性はアンプリコンの融解曲線により確認した。

組換えタンパク質の発現と精製

BbhIVは、C末端にヒスチジンタグ(His₆-tag)を付加した組換えタンパク質として大腸菌にて発現させた。下記において特に記載しない限り、DNA断片の連結にはIn-Fusion Snap Assembly Master Mix (TaKaRa Bio)を用いた。BbhIVの29-1934アミノ酸残基をコードする遺伝子領域を*B. bifidum* JCM 1254のゲノムを鋳型としてKOD-one (Toyobo)を用いて増幅させ、pET3-a (Merck-Millipore)と連結することにより、pET3a-BbhIV (His₆)発現プラスミドを作製した。塩基配列を確認したのち、*E. coli* BL21 (DE3) Δ lacZ-CodonPlus (42)に導入した。BbhVにおいては、35-1111アミノ酸残基を発現領域とし、PCR増幅後にpET23b (Merck-Millipore)に挿入した[pET23b-BbhV- (His₆)]。組換え大腸菌は、AmpおよびCmを含むLB培地にて25 °Cで培養し、OD₆₀₀値が0.4 - 0.5の時に終濃度1 mMとなるようにisopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を添加した。さらに24時間培養後に菌体を回収し、破碎用バッファー[300 mM sodium chloride、10 mM imidazole、50 mM HEPES (pH 8.0)]

に再懸濁した。Q125 sonicator (QSonica, Newtown, CT)を用いた超音波処理により細胞を破碎し、遠心により細胞デブリを除いて得られる無細胞抽出液からNi-nitrilotriacetic acid spin column (Ni-NTA spin column, Qiagen, Hilden, Germany)を使用してタンパク質を精製した。Amicon® Ultracel-10 K centrifugal filters (Millipore, Burlington, MA)を用いて脱塩したのち、ÄKTA pure™ 25 systemを用いて陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(Mono Q 5/50 GL)に供した。なおこの際、20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)中で0 - 0.5 M NaClの濃度勾配をかけて溶出させた。

得られたタンパク質画分の純度は、SDS-PAGE後にcoomassie brilliant blue (CBB)染色(Quick-CBB, Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)することで確認した。高純度の画分を合一し、Amicon® Ultracel-10 K遠心フィルターを使用して濃縮して精製品とした。タンパク質濃度は、BbhIV-His₆では250170 M⁻¹cm⁻¹およびBbhV-His₆では204440 M⁻¹cm⁻¹の理論モル吸光係数で280 nmでの吸光度を測定することによって決定した。測定にはNanoPhotometer (IMPLEN, Munich, Germany)を使用した。BbhI (33-1604 aa)の発現と精製は、所属研究室の後藤愛那博士がMiwaらの方法で調製したものを使用した(42)。

分子量はゲルろ過クロマトグラフィーを使用して決定した。カラムはSuperdex™ 200 Increase 10/300 GL (Cytiva)を使用し、150 mM NaClを含む10 mM Tris-HCl (pH 8.0)を用いて溶出させた。検量線は、thyroglobulin (669 kDa)、ferritin (440 kDa)、aldolase (158 kDa)、およびconalbumin (75 kDa)を用いて作成した。

酵素活性

BbhIVおよびBbhVの至適pHおよび至適温度の決定にはMcIlvaine buffer system (50 mM)を用いた。基質としては1 mM GlcNAc-*p*NPを使用した。反応液の10倍量の1M sodium carbonate溶液を加えて反応を停止させた後、405 nmの吸光度を測定し、遊離*p*NPを定量した。基質特異性は、4 mMの基質を適切なpHに調整した50 mM McIlvaine buffer (BbhIVはpH 5.0、BbhVはpH 5.5、BbhIはpH 6.0)を用いて検討した。反応混合物を1 μM酵素の存在下にて(コントロールには酵素非添加)、37 °Cで10分または120分インキュベートした後、80 °Cで10分間加熱して反応を停止させた。その後、*n*-butanol/acetic acid/water (2:1:1, 容量比)を展開溶媒とするTLCにより分析した(Silica Gel 60, Sigma-Aldrich)。糖は、diphenylamine・aniline・phosphoric acid mix (100 mL acetone, 1 g diphenylamine, 1 mL aniline, 10 mL phosphoric acid)を噴霧した後、加熱し糖を呈色した(56)。

速度論的解析を行う際は、反応初速度をGlcNAc-*p*NP濃度を変化させて求め(BbhIVは0.1-6.25 mM、BbhVは0.1-5.0 mM)、得られたデータをMichaelis-Menten式にカーブフィッティングさせることでパラメーターを算出した。算出にはGraphPad Prism v 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, CA)を使用した。ムチンO-結合型糖鎖に対する活性は、PGMを基質として調べた。100 μgのPGMに1 μgの各酵素を添加し(コントロールには非添加)、20 μLの総容量で37 °Cにて24時間インキュベートした後、反応溶液を凍結乾燥し

て以下に記載するようにO-結合型糖鎖解析に供した。

O-結合型糖鎖の解析

O-結合型糖鎖解析は既報に従って行った (43, 57)。実験フローはSupplementary Figure S1に示す。

β脱離によるムチン糖タンパク質からのO-結合型糖鎖の切り出しと精製

*B. bifidum*培養液に4倍量の氷冷acetoneを添加して20分間氷上に静置し、20,400 g、4°Cにて20分間遠心して沈殿を回収した。得られた沈殿物に対して、0.5 mLの1 M sodium borohydrideを含む100 mM sodium hydroxide溶液を加えて混和し、45°Cにて18時間インキュベートした(還元的β脱離反応)。この際、はじめの約2時間は15分おきにボルテックスにて混和させた。反応液を直ぐに氷冷、10% acetic acidを添加することで反応を停止させた後、標準物質として1 nmolのLNFP Iを添加し、約1 mLのDowex 50WX8 (hydrogen form)陽イオン交換樹脂(Sigma-aldrich)に供した。5% acetic acidにて溶出して凍結乾燥後、得られたサンプルを300 μLの90% methanol、10% acetic acidに溶かして窒素ガス噴霧下にて乾燥させた。これを3回繰り返し、残存ホウ素を除去した。その後、5% acetic acidに溶解させた糖鎖サンプルをSep-Pak C₁₈ cartridge column (100 mg, Waters, Milford, MA)に供し、5% acetic acidにて溶出後、凍結乾燥を行った。次に、graphitized carbon cartridge column (InertSep GC column, 150 mg/3 mL, GL Sciences, Tokyo, Japan)を12 mLの0.1% trifluoroacetic acidを含む80% acetonitrile (ACN)で活性化した後、8 mLの超純水で洗浄したカラムに1 mLの超純水で溶解させたサンプルを供して吸着させた。超純水1 mLで洗浄後、3 mLの0.05% trifluoroacetic acidを含む25% ACNにて溶出させた。窒素ガスを用いてACNを蒸発させた後に、凍結乾燥を行い、O-結合型糖鎖 (還元末端アルジトール体)の混合物を得た。

糖鎖の完全メチル化と相分離

精製したアルジトール体をMALDI-TOF/MS分析に供するため、糖鎖の完全メチル化処理を行った(58)。まず、塩基性のdimethyl sulfoxide (DMSO)溶液を以下の方法にて調製した。すなわち、200 μLの50% sodium hydroxide溶液と400 μLのmethanolをボルテックスで混合し、次に4 mLのDMSOを加えてボルテックスした後、470 gで3分間遠心し上清を取り除く操作を5回繰り返した。その後、2 mLのDMSOを加えてピペッティングで静かに混和することで調製した。上述の乾燥済み糖鎖サンプルに200 μLのDMSOを加え、上部の空気を窒素に置換してから溶解させた。250 μLの塩基性DMSO溶液と100 μLのiodomethaneをサンプル溶液に加え、窒素ガスで空気を置換後、5分間激しくボルテックスした。ついで、2 mLの超純水を加えて濁りが無くなるまで良くピペッティングした後、2 mLのchloroformを加えてボルテックスした。470 gで3分間の遠心後に上清を除去し、超純水2 mLを加える操作を4回繰り返した。最後に上清を取り除き、窒素ガスで乾燥さ

せた。乾燥サンプルに300 μ Lの50% methanolを加えて溶解させた後、1 mLのACNと等量のmethanolで活性化した後に3 mLの超純水で平衡化させたSep-Pak C₁₈ cartridge column (100 mg)に吸着させて夾雑物を取り除いた。糖鎖は1 mLのmethanolで溶出させた後に窒素乾固し、これを完全メチル化糖鎖サンプルとした。

MALDI-TOF/MSによる質量分析

乾固させたメチル化糖鎖サンプルに2 μ Lのマトリックス (20 mg/mL 2,5-dihydroxybenzoic acid含有50% methanol)を加え、MALDIプレートに1 μ Lずつ供し、乾燥・結晶化させた。分析にはAutoflexIII smartbeam (Bruker, Billerica, MA)を使用し、装置の操作およびデータ処理はFlex ControlソフトウェアおよびFlex Analysisソフトウェア (Bruker)を用いて行った。MALDI-TOF/MS解析にはLIFTを用いた。測定はpositive ion modeおよびreflect modeで m/z 400 - 3,000の範囲で行った。質量校正には、angiotensin II (m/z 1046.5418)、angiotensin I (m/z 1296.6848)、substance P (m/z 1347.7354)、bombesin (m/z 1619.8223)、およびsomatostatin 28 (m/z 3147.4710)を用いた。得られた m/z の値を基に、ExPASy GlycoMod (<https://web.expasy.org/glycomod/>)を用いて糖鎖組成を推定した。

B. bifidum JCM 1254における**bbh**遺伝子欠損

B. bifidum JCM1254ゲノム上の**bbhI**、**bbhIV**、および**bbhV**はシングルクロスオーバー相同組換えによって破壊した(Figure II-3A)。破壊用プラスミドとしては、pMSK151 (Sp^R)とpMSK207 (Cm^R)を用いた(59)。**bbhI**、**bbhIV**、または**bbhV**の約500bpの内部領域をPCRにて増幅させ、pMSK151のSacIサイトへ挿入し、得られたそれぞれのプラスミドをエレクトロポレーション法により*B. bifidum* JCM1254に導入し、Spを添加したGAM寒天培地にて挿入変異株を選抜した。**bbhI/bbhIV**二重変異株は、**bbhIV**変異株(Sp^R)の**bbhI**部位にpMSK207 (Cm^R)をもとに上記と同様に作製した**bbhIV**破壊用プラスミドを挿入することにより得た。標的遺伝子内にプラスミドが組込まれたことについては、ゲノムから増幅させたPCR産物の塩基配列を確認することで確認した(Figure II-3B)。使用したプライマーと鋳型は、Supplementary Table S1に示す。

*B. bifidum*株の遺伝子破壊を行うにあたり、まず、Sakanakaらの方法(60)、Parkらの方法(61)、およびSerafiniらの方法(62)を用いて、その形質転換効率を比較した。なお、効率測定にはpKKT427を用いた(63)。最終的な形質転換法は以下の通りである。すなわち、0.2 M sodium chlorideと0.2 M sucroseを添加した100 mL MRS培地(BD Difco™)にて対数増殖期(OD₆₀₀=0.4-0.5)まで増殖させた後、遠心分離(16000 g、10分、4 °C)により細胞を回収した。このペレットを氷冷した20 mLの形質転換用バッファー[0.5 M sucrose、1 mM ammonium citrate (pH 6.0)]に懸濁して遠心分離により回収する操作を4 mLの同バッファーで5回繰り返した。最後に、菌を1 mLの形質転換用バッファーに懸濁し、200 Ω 、15 kV/cm、25 μ Fの条件でエレクトロポレーションを行った。回復培養は、嫌気条件下で3

時間行い(60)、コロニーが確認できるまで嫌気条件下で培養した。

陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (High-performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection : HPAEC-PAD)を用いた単糖の定量

*B. bifidum*株[WT、BbhI⁻、BbhIV⁻、BbhV⁻、およびBbhI⁻/BbhIV⁻]をPGMを含む溶液でインキュベートし、O-結合型糖鎖から遊離する単糖を経時的に定量した。まず、*B. bifidum*をムチンO-結合型糖鎖構成糖(Fuc、Gal、GlcNAc、GalNAc、Neu5Ac：各0.2%)を添加し

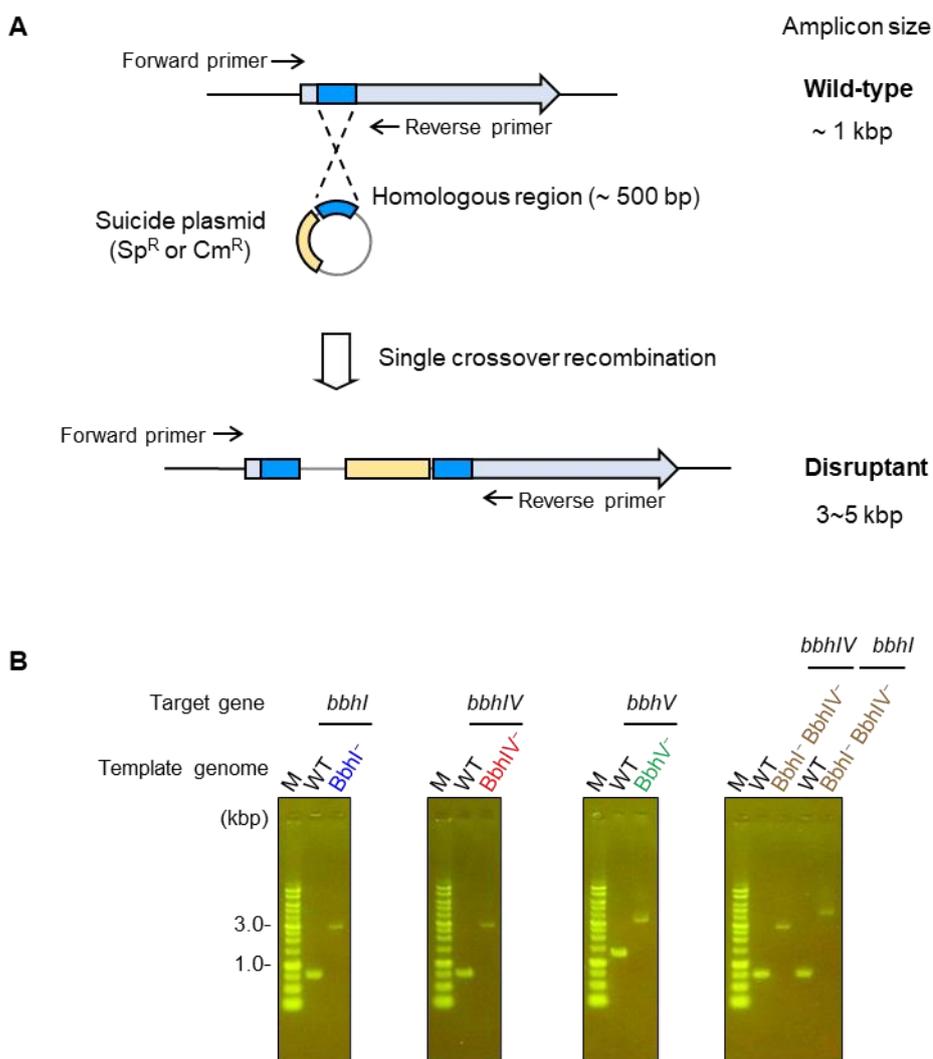


Figure II-3. *B. bifidum* JCM 1254における*bbhI*、*bbhIV*、および*bbhV*遺伝子の破壊 (A)シングルクロスオーバーによる標的遺伝子破壊スキーム。各遺伝子内に設定した約500 bpの相同領域を挿入したpMSK151 (Sp^R)またはpMSK207 (Cm^R)を、エレクトロポレーションにて*B. bifidum*に導入することで標的遺伝子を破壊した。(B)ゲノムPCRの電気泳動。WT株、BbhI⁻株、BbhIV⁻株、BbhV⁻株、およびBbhI⁻/BbhIV⁻株のゲノムを鋳型とした。相同組換えに使用した領域の外側に結合するプライマーを用いてPCRおよびシーケンスを行い、プラスミド配列が標的位置に挿入されていることを確認した。

たmMRS培地で対数増殖期($OD_{600} = 0.4 - 0.6$)まで培養した後、遠心分離により回収し、PBSで2回洗浄した。次に、ABCトランスポーターおよびmajor facilitator superfamilyトランスポーターの阻害剤である5 mM verapamilおよび50 μ M carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) (64)を添加したPBSに OD_{600} 値が0.8となるように再懸濁し、37 °Cで30分間インキュベートした後、等量の1% PGM溶液を加えて反応を開始させた。経時的にサンプルを採取し、直ちに80 °Cで3分間加熱することで反応を停止させた。糖の定量は、CarboPac PA1カラム(2 × 250 mm, Dionex)を用いて、Dionex ICS-3000システム(Thermo Fisher Scientific)にて行った。なお、カラムは30 °Cで保温した。溶媒は水(移動相A)、250 mM sodium hydroxide (移動相B)、および1 M sodium acetate (移動相C)とし、流速0.25 mL/minで溶出させた。溶出(移動相A/B/Cの割合)は、最初の17分間は94%/5.5%/0.5%で中性糖を検出し、次の10分間は46%/50%/4.0%への勾配をかけてNeu5Acを検出した。その後、カラムは35%/50%/15%で10分間洗浄した。検量線は既知濃度の糖標品で作成した。

PGM添加培地での*B. breve*と*B. bifidum*の共培養

共培養の際には、pMSK219 (Tet^R)を導入してテトラサイクリン耐性を付与した*B. breve* JCM 1192を用いた。*B. breve*/pMSK219 (Tet^R)を*B. bifidum* WT株またはBbhI/BbhIV株と0.5% PGMおよびTet (10 μ g/mL)を添加したmMRS培地に接種して共培養を開始した。この際、*B. bifidum*および*B. breve*はそれぞれの OD_{600} 値が0.01および0.1に相当するように添加した。*B. breve*の経時的な増殖はTetを添加したGAM寒天培地上でCFUを測定することで評価した。本共培養時には静菌的作用を有するTetを添加しているために、pMSK219 (Tet^R)を導入した*B. breve*は増殖することが可能であるが、*B. bifidum*は静菌培養となる。なお、別途同条件において*B. bifidum*のみを培養した際には自然発生的なTet耐性株は出現しなかった。上清中の単糖は、上記と同じ条件下でHPAEC-PADを用いて定量した。

系統樹の作製

BbhIVとBbhVの系統樹解析には、2022年9月時点でCarbohydrate-Active enZymes Database (CAZyゲノムデータベース)に登録されていた14種類の酵素化学的に解析されたGH84酵素(65)、*C. perfringens*由来の2種類の同定された酵素(49)、およびムチン分解菌として知られる*A. muciniphila* ATCC BAA-835、*B. caccae* ATCC 43185、および*B. fragilis* NCTC 9343由来の未解析ホモログを使用した。これらのGH84ホモログのアクセッション番号はFigure II-21に記載している。なお、系統樹の作成にはProtein Families Database (Pfam) (66)で抽出した触媒ドメインのみを使用した。アラインメントと系統樹の構築にはClustal omega (67)とFigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>)を用い、デフォルト設定で行った。

結果

ムチンO-結合型糖鎖の分解を担うβ-N-acetylglucosaminidaseの探索

一般的に、糖鎖からGlcNAcを遊離する酵素としては、β-GlcNAcに特異的なβ-N-acetylglucosaminidaseとβ-GlcNAcとβ-GalNAcの両方に作用可能なβ-N-acetylhexosaminidaseが知られている。Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) Database (<http://www.cazy.org/>)を検索したところ、β-N-acetylglucosaminidase活性とβ-N-acetylhexosaminidase活性はGH3、5、18、20、84、85、109、116、および163に分類される酵素が有していた(65)。次に、CAZyに登録されている13菌株の*B. bifidum*ゲノムを調べたところ、すべての株に共通してGH3酵素が1つ、GH20酵素が4つ、またGH84酵素が2つコードされていた。これら糖質分解酵素のうち3つのGH20酵素および2つのGH84酵素はN末端側に推定シグナルペプチドを有しており(68)、その他の酵素は細胞内に位置していると推定された。前述の通り、GH20酵素の3つは既に細胞外酵素lacto-N-biosidase (LnbB)、β-1,3-N-acetylglucosaminidase (BbhI) (42)、および6-O-sulfo-β-N-acetylglucosaminidase (sulfoglycosidase) (BbhII) (43, 44)として同定されているが、2つのGH84酵素の機能は明らかとされていない。そこで、これらの遺伝子がムチンO-結合型糖鎖の分解に関与する可能性を調べるために、炭素源としてPGMを添加したmMRS培地で*B. bifidum*の培養を行い、*bbhI* (GH20)と2つのGH84遺伝子の転写プロファイル調べた。この際、既にPGMによる発現上昇が報告されている*bbhII* (GH20 sulfoglycosidase)も同時に解析を行った。なお、比較のためにlactose (Lac)添加培地を対照として使用した。また、*B. bifidum* JCM 1254のゲノム配列情報は所属研究室で決定されていた未発表時のものを使用し(69)、2つのGH84酵素[locus_tag: BbifJCM1254_12430 および BbifJCM1254_17960]は、それぞれBbhIVおよびBbhVと命名した。GenBank accession番号は、それぞれGJM46876.1およびGJM47429.1である。

PGMを添加したmMRS培地で*B. bifidum*を培養すると、Lacを糖源として培養した場合と比較して対数増殖期において*bbhI*、*bbhII*、および*bbhIV*の転写がそれぞれ11倍、2.9倍、および2.5倍上昇した(Figure II-4A、*t*-test)。定常期においても、*bbhI*、*bbhII*、および*bbhIV*の転写レベルはLac添加培地で培養した際よりもPGMで培養した際で高く、特に*bbhIV*の転写レベルが3.9倍と最も高かった(Figure II-4B)。*bbhV*は対数増殖期には誘導されなかったが定常期にわずかであるが転写が有意に上昇した。なお、本研究の途上で所属研究室の加藤らによってBbhIIが6-O-sulfo-GlcNAcに高い特異性を示し、GlcNAcには全く作用しないことが明らかとなったため(43)、ムチンO-結合型糖鎖上のGlcNAcにはBbhI (GH20)およびBbhIV (GH84)が関与するものと考え、更なる解析を進めることとした。なお、PGM添加培地における*bbhV*の転写量は*bbhIV*のそれと比較して1/5程度であったが、GH84酵素自体の報告例が少ないために以降の解析に含めることとした。

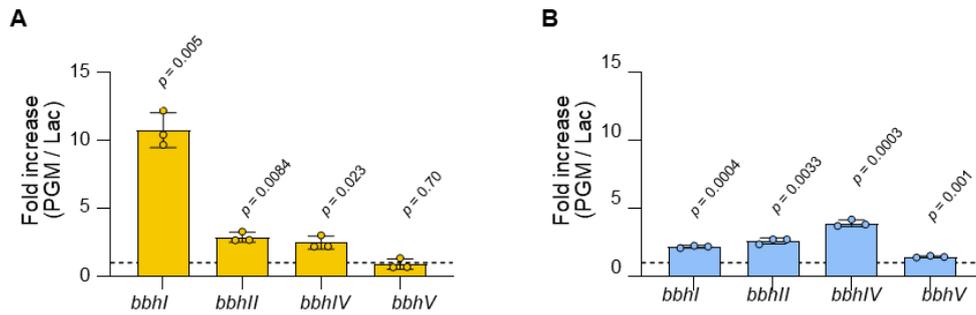


Figure II-4. *B. bifidum* JCM 1254がもつ膜アンカー型 β -*N*-acetylglucosaminidaseホモログの転写誘導解析

0.5% PGMまたはLacを炭素源として添加したmMRS培地にて、*B. bifidum* JCM 1254を対数増殖期 ($OD_{600} = 0.4 - 0.6$) (A)および定常期 ($OD_{600} = 0.8 - 3.0$) (B)まで培養した。*uvrD*をリファレンス遺伝子とし、各遺伝子の相対的な発現レベルを求めた。グラフには、平均 \pm SD、およびt-testから得られたp値を示す。

BbhI、BbhIV、およびBbhVの特性評価

Pfam (66)で解析したBbhI、BbhIV、およびBbhVの各ドメイン構造をFigure II-5Aに示す。BbhIは全長1627アミノ酸残基で、Miwaらが報告した通りGH20触媒ドメインと3つのcarbohydrate-binding module (CBM32)ドメインからなる(42)。BbhIVは1960アミノ酸からなるポリペプチドで、シグナル配列(1-29 aa)、GH84触媒ドメイン(184-486 aa)、2つのガラクトース結合様(galactose-binding domain-like : GBL)ドメイン(820-931と1075-1154 aa)、3つのFound In Various Architectures (FIVAR)ドメイン(1364-1425 aa、1432-1496 aa、1567-1625 aa)、および末端の膜貫通領域(1935-1954 aa)が存在する。なお、GBLドメインは真核生物および原核生物の両方で見られ、ある特定の糖鎖リガンドに結合するドメインとされている。また、FIVARドメインは細胞壁に関連するタンパク質にしばしば見られ、GlcNAc結合ドメインと推定されている(70)。BbhVは、FIVARドメインは持たないが、BbhIVと同様のドメイン構造を有する全長1139アミノ酸のポリペプチド鎖であり、N末端シグナルペプチド(1-34 aa)、GH84触媒ドメイン(212-524 aa)、GBLドメイン (727-848 aa)、C末端の膜貫通領域(1112-1134 aa)から構成されている。BbhIVとBbhVのGH84触媒ドメイン間のアミノ酸配列相同性は52 %であり、BbhVのGBLドメインとBbhIVの上流側および下流側のGBLドメインとの相同性は、それぞれ28 %および12 %であった。また、BbhIVの2つのGBLドメイン間の相同性は22 %と低かった。

酵素学的解析を行うにあたり、BbhIVおよびBbhVのシグナル配列と膜貫通領域を除く領域(それぞれ29-1934 aaおよび35-1604 aa)を異種発現させた。なお、組換え酵素にはC末端にヒスチジンタグを付加し、アフィニティーカラムと陰イオン交換カラムを用いて電気泳動的に単一なバンドにまで精製した(Figure II-5B)。BbhI (33-1604 aa)は、Miwaらの報告のとおり発現および精製した (データ非掲載)(42)。ゲルろ過クロマトグラフィー

の結果、BbhIVの質量は264 kDaとして、またBbhVの質量は171 kDaと推定され、溶液中ではそれぞれ単量体および二量体にて存在していることが示唆された(Figure II-5C)。GlcNAc-*p*NPに対する活性は、BbhIVおよびBbhV共に45 °Cの条件下で失活しなかった。活性はpH 5.0および5.5で最大となり、それぞれpH 5.5-8.0およびp7.5-8.0で安定であることを確認した。Syプロットによって至適pHでのGlcNAc-*p*NPに対する K_m 値および k_{cat} 値を算出したところ、BbhIVでは1.6 mMと67 s⁻¹、BbhVでは1.0 mMと73 s⁻¹となった(Figure II-5D)。この値は、Miwaらによって報告されたBbhIの値(pH 6.0で1.2 mMと210 s⁻¹)と比較しても妥当であり、GH20とGH84が、基質であるGlcNAcの*N*-acetyl基を利用して反応を補助する基質補助型メカニズムを利用していることを反映しているものと考えられた(42)。

続いて、BbhI、BbhIV、およびBbhVの基質特異性をいくつかの天然基質と人工発色基質を用いて決定した(Figure II-6およびTable II-1)。ムチン*O*-結合型糖鎖のcore構造については、BbhIはcore 3構造の β -(1→3)-GlcNAc結合をよく分解したが、core 2構造の β -(1→6)-GlcNAc結合にはほとんど作用しなかった(Figure II-6Aおよび6B)。一方で、BbhIVとBbhVにはcore 3構造のGlcNAcに対する活性が見られなかったが、core 2構造のGlcNAcには高い活性を有していた(Figure II-6Aおよび6B)。また、BbhIVは還元末端がThrに結合したcore 2構造(core 2-Thr)に対してBbhVよりも高い活性を示した。しかし、その還元末端が*p*NPで修飾されている場合は、両酵素の活性には差異が見られなかった(Figure II-6C)。ムチン*O*-結合型糖鎖以外の基質として、真核生物の翻訳後修飾の一つであるGlcNAc1- β -*O*-Ser (*O*-GlcNAc)構造を使用した場合は、BbhIとBbhVではほとんど加水分解されず、BbhIVで加水分解された(Figure II-6D)。N-結合型糖鎖に見出される二糖構造GlcNAc β 1-2ManはBbhIVとBbhVによってよく分解されたが、BbhIではそれほど分解されなかった(Figure II-6E)。Lacto-*N*-triose IIに存在する β -(1→3)-GlcNAc結合の分解能は3つの酵素間で異なっており、core 3-Thr構造に存在する β -(1→3)-GlcNAc結合で見られた結果とは一致しなかった(Figure II-5F)。つまり、BbhIVとBbhVでは、その(+)*S*サブサイトにおける基質認識機構が異なることが示唆された(Figure II-6Aおよび6F)。N,N-Diacetylchitobiose (GlcNAc β 1-4GlcNAc)は3つの酵素の基質としてほとんど機能しないことが分かった(Figure II-6G)。BbhIVのGalNAc-*p*NPに対する活性は、GlcNAc-*p*NPへの分解活性の0.3%であったため、本酵素は β -*N*-acetylhexosaminidaseではなく、*N*-acetylglucosaminidaseであることが明らかとなった。また、BbhI、BbhIV、およびBbhVともに6-*O*-sulfo-GlcNAc- β -*p*NPには作用しなかった。

また、Glc-*p*NPおよびGal-*p*NPに対するBbhIVの活性は、GlcNA-*p*NPへの分解活性の0.2%および0.1%であった。また、BbhVは、GlcNA-*p*NPの分解活性の1%程度の活性をGlc-*p*NPに対して示し、Gal-*p*NPは全く作用しなかった。これらの基質に対して活性が低いのは、前述の通りGH20およびGH84の触媒機構は基質補助型であるためと考えら

れる(51, 71)。これらのことから、BbhIVとBbhVは(-)サブサイトにおいて高い特異性を有することが示された。なお、サブサイトとは触媒ポケットに存在する糖認識部位を指しており、加水分解される部位より非還元末端側を(-)として、還元末端側を(+)として表記する。

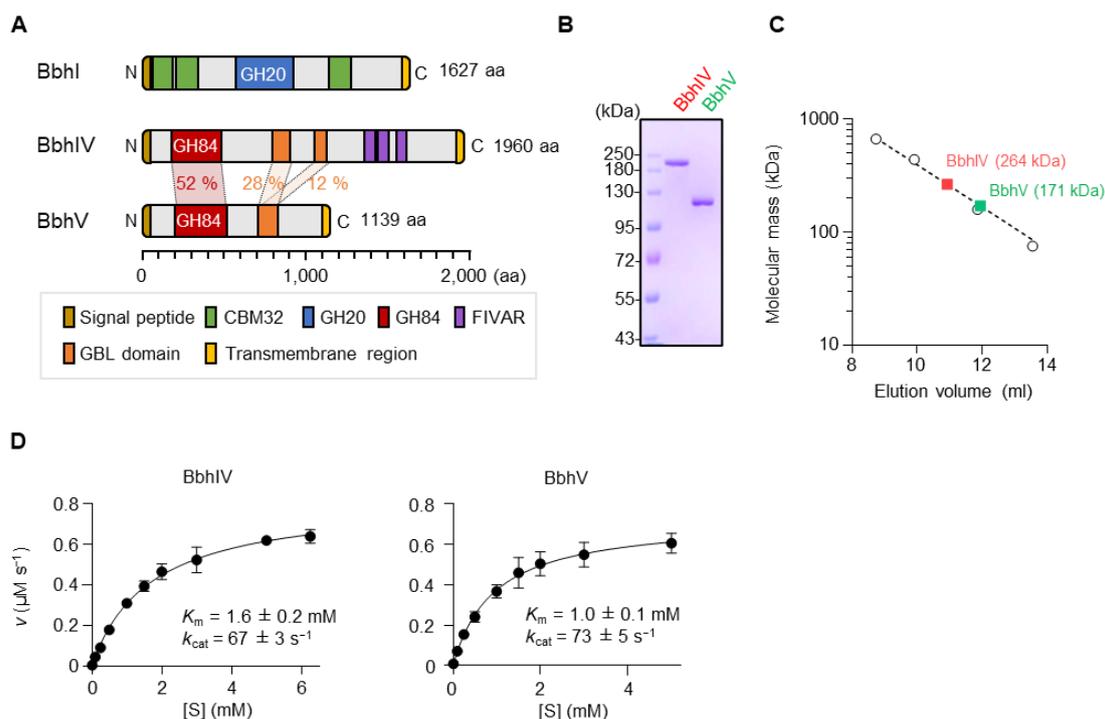


Figure II-5. 精製酵素BbhIおよびBbhIVの性状解析

(A) BbhI、BbhIV、およびBbhVのドメイン構造の模式図。シグナルペプチド、carbohydrate-binding module 32 (CBM32)ドメイン、glycoside hydrolase family 20 (GH20)ドメイン、glycoside hydrolase family 84 (GH84)ドメイン、found In Various Architectures (FIVAR)ドメイン、galactose binding like (GBL)ドメイン、および膜貫通領域は、それぞれ茶色、緑、青、赤、紫、オレンジ、黄色で示した。シグナルペプチドと膜貫通領域は、SOSUIサーバー(68)とTMHMM-2.0サーバー(72)を用いて推測した。ドメイン解析は、タンパク質ファミリーデータベース(Pfam)にて行った(66)。(B) 精製した組み換え酵素のSDS-PAGE。酵素1 μg を7.5%アクリルアミドゲルにアプライし、CBB染色を行った。(C)ゲルろ過クロマトグラフィーによるBbhIVおよびBbhVの質量の推定。Thyroglobulin (669 kDa)、ferritin (440 kDa)、aldolase (158 kDa)およびconalbumin (75 kDa)を質量マーカーとして用いた。近似曲線は、 $Y = 10^{(-1.871X + 4.469)}$ ($R^2 = 0.9931$)であった。(D) BbhIVおよびBbhVのpNP- β -GlcNAcによるSv-plot ($n = 3$ 、平均 \pm SD)。速度論的パラメーターは、GraphPad Prism v 8.4.3を用いてミカエリスメンテン式による曲線フィッティングすることで算出した。

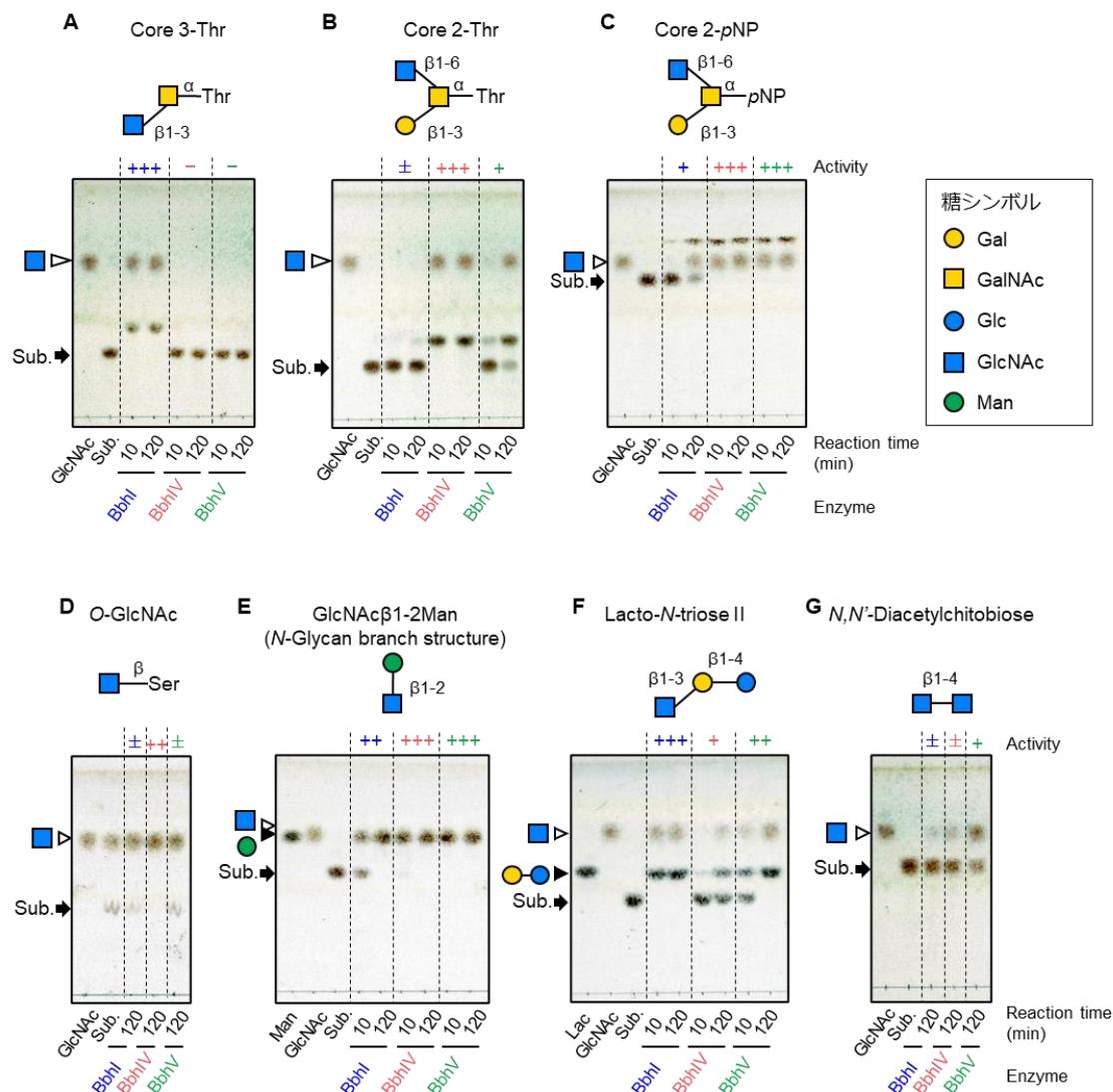


Figure II-6. 酵素基質反応溶液のTLC分析

精製酵素BbhI、BbhIV、およびBbhV(それぞれ1 μ M) を4 mM のcore 3-Thr (A)、core 2-Thr (B)、core-2 pNP (C)、O-GlcNAc (D)、GlcNAc β 1-2Man (E)、lacto-N-triose II (F)、およびN, N'-diacetylchitobiose (G)とインキュベートした。10分および120分間反応させたのち、95 $^{\circ}$ Cで加熱することにより停止させた。基質は \blacktriangleright で示した。GlcNAc、Man、およびLacを標品として用いた。Table II-1には+/-で示す活性評価を記した。O-GlcNAc (D)で使用した基質には、もともとGlcNAcが多く含まれている。糖シンボルは、The Nomenclature Committee of the Consortium for Functional Glycomicsに従った(47)。

Table II-1. *B. bifidum*のBbhI、BbhIV、およびBbhVの基質特異性一覧

Substrate ^a	Structure	Activity ^b		
		BbhI	BbhIV	BbhV
N-Glycan branching structure	GlcNAcβ1-2Man	++	+++	+++
Lacto-N-triose II	GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc	+++	+	++
N,N'-Diacetylchitobiose	GlcNAcβ1-4GlcNAc	±	±	+
O-GlcNAc	GlcNAcβ1-O-Ser	±	++	±
Core 2-pNP	Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAcα-pNP	+	+++	+++
Core 2-Thr	Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAcα-O-Thr	±	+++	+
Core 3-Thr	GlcNAcβ1-3GalNAcα-O-Thr	+++	-	-
Core 4-Thr	GlcNAcβ1-3(GlcNAcβ1-6) GalNAcα1-O-Thr	+	+++	++

a. BbhIVとBbhVのGlcNAcβ-pNPおよびGalNAcβ-pNPへの活性は本文中に記載した。BbhIのGalNAcβ-pNPへの活性は、GlcNAcβ-pNPに対する活性の0.3%であった(42)。

b. 活性は以下のように示す；(+++): 10分間で完全分解；(++): 10-120分間で完全分解；(+): 120分間で一部分解；(±): 120分間でわずかに分解；(-): 120分間で全く分解しない。4 mMの基質と1 μM 精製酵素を用いて調べた (Figure II-6)。

BbhI、BbhIV、またはBbhV処理したPGMのO-結合型糖鎖分析

次に、精製酵素を作用させたPGMのO-結合型糖鎖の半定量網羅解析(グライコムクス解析)を行い、各糖鎖分子種の推定量を酵素未処理サンプル(control)と比較することで、基質となる糖鎖構造を推察することとした(Figure II-7A)。精製酵素を糖タンパク質に作用させた場合は、非還元末端に露出した糖残基にのみ作用可能となる。酵素処理後に還元的β脱離反応でO-結合型糖鎖をPGMから遊離させると共に還元末端のGalNAcをalditol体とし、定法に従ってメチル化した糖鎖サンプルをMALDI-TOF/MS解析に供した。なお、前述した通り3種の酵素のいずれもが6-O-sulfo-GlcNAc-β-pNPに作用しなかったことから、本糖鎖解析では非硫酸化糖鎖のみを解析対象とすることにした。FDR補正後のデータを用いてvolcano plotをしたところ、完全メチル化した非硫酸化アルジトール(ナトリウム付加体)として検出された38種のO-結合型糖鎖のうち(Supplementary Table S2)、BbhIV処理によってm/z 1025、1719、2026、および2168の4つのイオンピークの強度が1.5倍以上減少した($q < 0.15$ を選択) (Figure II-7B)。

酵素未処理PGMサンプルから得られたイオンピーク m/z 1025 (Hex1HexNAc2GalNAc-itol)のMS/MS解析では、core 1およびcore3 tetrasaccharideを示すm/z 298および749フラグメントイオン、core 2 tetrasaccharide bおよびcore 4 tetrasaccharide a/bを示すm/z 260および787フラグメントイオンが検出されなかったため、本ピーク中には主にcore 2 tetrasaccharide aが含まれていると考えられた(Figure II-8A)。一方で、BbhIV処理後のPGM

サンプルには、 m/z 260および787のフラグメントイオンが検出された(Figure II-8B)。さらにcore 2 tetrasaccharide *b*の存在を示唆するフラグメント m/z 520および527も検出された。これらの結果は、イオンピーク m/z 1025を持つ糖鎖分子種において、core 2 tetrasaccharide *a*の量が相対的に減少したことを示している。つまり、PGMのO-結合型糖鎖は非常に密度が高く存在するために短い糖鎖構造への酵素の作用は制限されたと推測されるものの、BbhIVはcore 2 tetrasaccharide *a*の末端 β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAcを分解したことが強く示唆された。

酵素未処理サンプルにおける m/z 1719、2026、および2168の3つのイオンピークのMS/MS解析では、それぞれ末端HexNAcにおいて断片化がおこった結果として260 Da減少したフラグメントイオン m/z 1459、1766、および1908が検出されたが(Figure II-9)、これらのフラグメントイオンはBbhIV処理後に消失、あるいは他のフラグメントイオンと比較してイオン強度が減少していた。このことから、BbhIV処理により末端のHexNAcが遊離したことが強く推察された(酵素処理によりHexNAcが遊離したために、当該フラグメントを生じる親イオン分子種が相対的に減少した)。また、BbhIV処理により m/z 1781 (Fuc2Hex3HexNAc2GalNAc-itol)の推定糖鎖量は1.5倍以上に増加していた。これは、 m/z 2026 (Fuc2Hex3HexNAc3GalNAc-itol)の糖鎖が分解を受けて m/z 1781の推定量が増加した可能性が考えられるが、それを明瞭に示すMS/MSフラグメントパターンは得られなかった。

BbhI処理によっては、 m/z 2475のイオンピークの推定糖鎖量が増加した。しかしながら、糖鎖組成が複雑であることに加えて糖鎖量が十分でなかったため、MS/MS解析を行うことが出来なかった。BbhV処理したサンプルにおいては顕著な変化は検出されなかった。

以上の結果から、TLC解析から予想された通り、ムチン糖タンパク質上においてもBbhIVは末端に結合した β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAcに作用することが強く示唆された。なお、BbhI処理においてほとんど推定糖鎖量に変化が無かったのは、通常、Galによって伸長してLacNAc (Gal β 1-4GlcNAc)構造を形成しており、BbhIの基質と推測される β -(1 \rightarrow 3)-GlcNAc構造が糖鎖の非還元末端には露出していないためであると推察された。BbhVによって推定糖鎖量に変化が無かった理由は定かではないが、TLC解析の結果ではBbhIVとは異なる(+)サブサイトを有することが示唆されており、ムチンO-結合型糖鎖は本酵素の真の基質ではない可能性が考えられた(後述)。

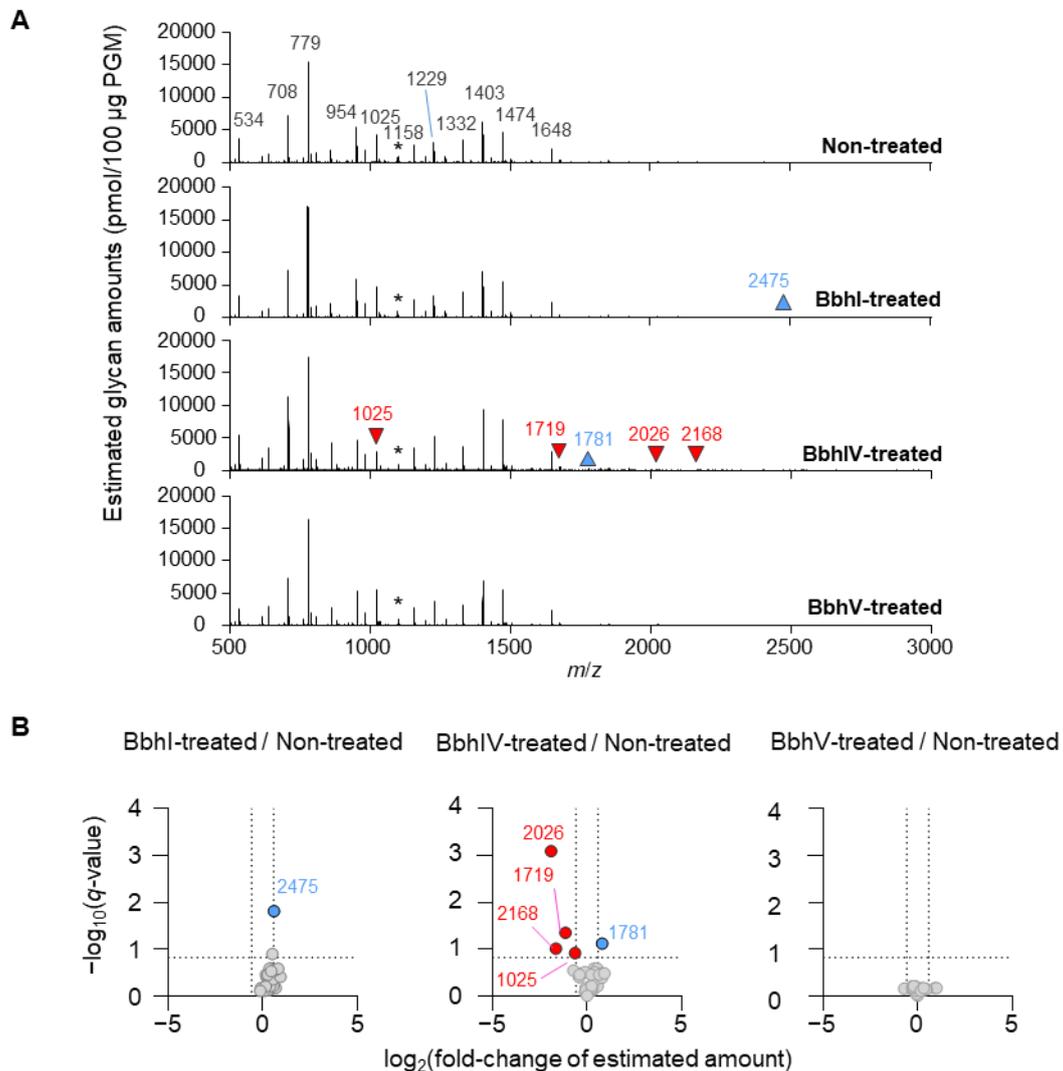


Figure II-7. PGMのO-結合型糖鎖に対する精製酵素の作用

(A) 精製組換え酵素Bbhl、BbhIV、またはBbhVと24時間インキュベートしたPGMから得られた完全メチル化非硫酸化O-結合型糖鎖アルジトール体のマススペクトル(m/z 500-3000)。未処理(コントロール)のPGMも比較のために分析した。赤と水色の矢印は、酵素処理により推定量がそれぞれ減少または増加したイオンピークを示す(糖鎖組成と推定糖鎖量については、Supplementary Table S2に記載)。*は、標準物質として添加したLNFPIを示す。(B) 酵素処理したPGMから得られた各イオンピークの推定量をコントロールと比較した時のvolcano plot($n=3$)。酵素処理後、 q 値が0.15未満で推定糖鎖量が1.5倍以上変化したピークを特定した。 q 値は、FDR補正およびmultiple t testsによって得られた p 値である。

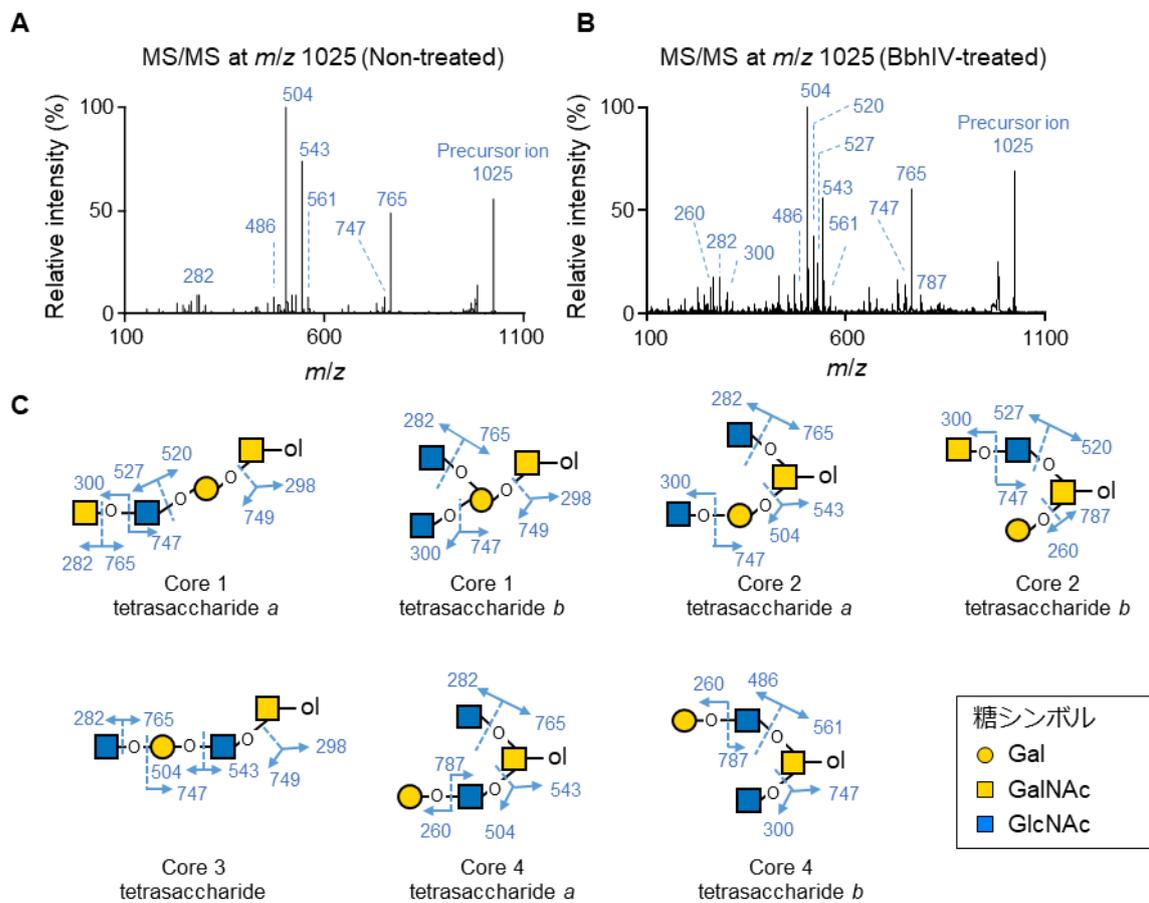


Figure II-8. BbhIVによって減少したイオンピーク m/z 1025 における MS/MS スペクトル (A および B) 酵素非処理コントロールサンプル (A) および BbhIV 処理サンプル (B) から得られたイオンピーク m/z 1025 の MS/MS スペクトル。(C) A および B のフラグメントパターンから推測される O-結合型糖鎖異性体構造。糖シンボルは、The Nomenclature Committee of the Consortium for Functional Glycomics に従った(47)。

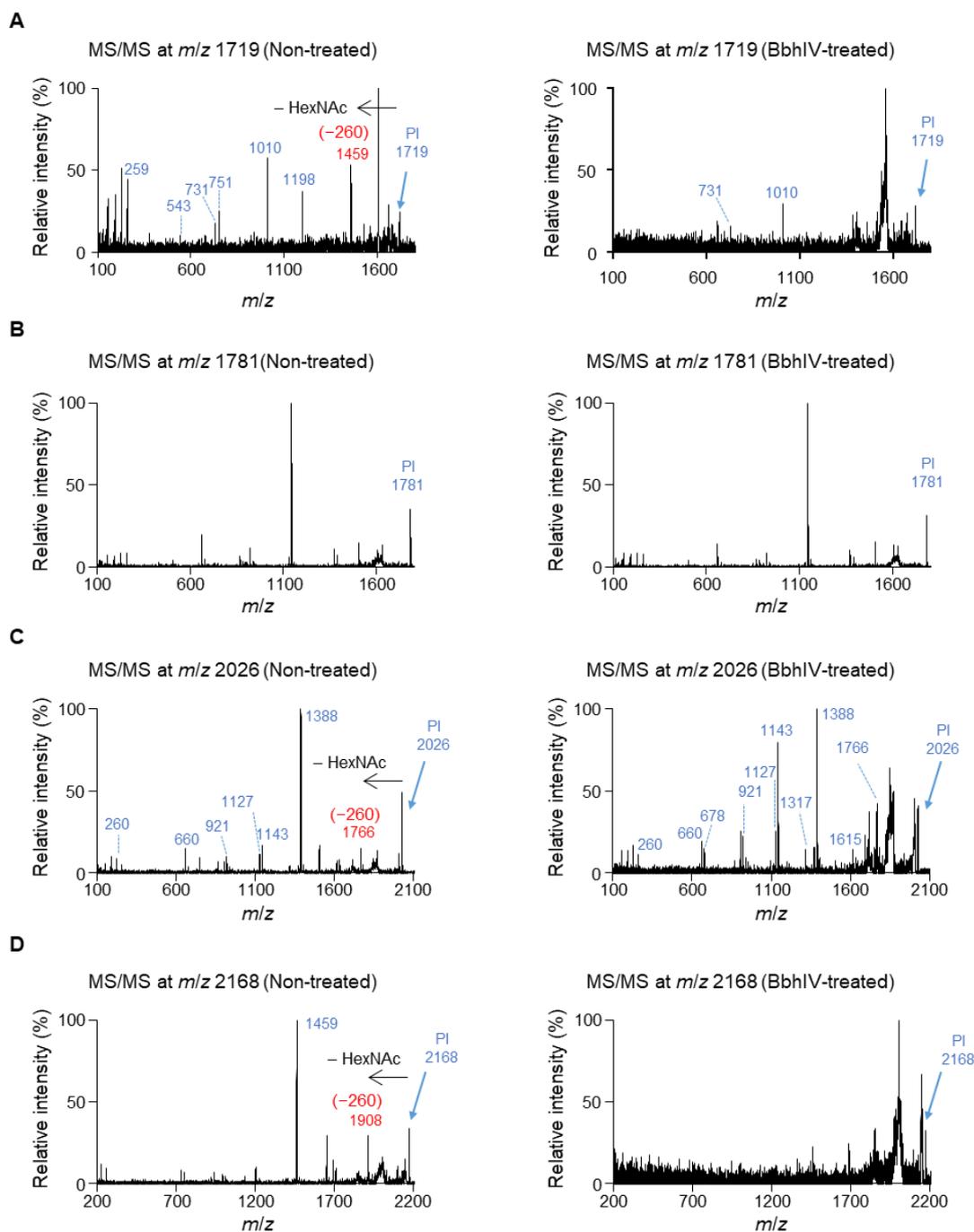


Figure II-9. BbhIV処理により変化したPGM糖鎖のMS/MSスペクトル

(A-D) m/z 1719 (A)、1781 (B)、2026 (C)、および2168 (D)のMS/MSスペクトルを示す。左は酵素非処理コントロールサンプル、右はBbhIV処理したものを示す。260 Da減少したフラグメントが生じる場合、親イオンピークには非還元末端に結合したHexNAcを有する分子種が含まれることを意味する。

ムチン糖鎖分解におけるBbhI、BbhIVおよびBbhVの役割

*B. bifidum*によるムチンO-結合型糖鎖分解における β -N-acetylglucosaminidaseの生理的役割を調べるために、欠損株を作出することを検討した。まず、*B. bifidum*の形質転換効率について、Sakanakaらの方法、Parkらの方法、Serafiniらの方法を使用して調べた。各方法の詳細なプロトコルはTable II-2に記載した。4種の*B. bifidum*株(JCM 1254、JCM 7004、TMC3108、およびTMC3115)を用いて調べた結果、Parkらの方法を使用した際に、株に依存せず最も良い形質転換効率を得られたため(Figure II-10)、欠損株の作出は原則的にParkらの方法に従った。

Table II-2. *B. bifidum*形質転換方法の検討

	Sakanakaらの方法	Parkらの方法	Serafiniらの方法
DNA量	1 ug	1 ug (DNA添加後、氷冷しながら20分間放置し、その後、終濃度2%となるようにethanol添加。10分間氷冷しながら放置後、すぐにパルス)	1 ug (DNA添加後、氷冷しながら2時間放置し、その後パルス)
本培養	GAM培地	0.2 M NaClおよび0.2 M sucroseを含むMRS (0.05 % L-cysteine HCl)	16 % FOS MRS, 10 % GOS MRS (0.05 % L-cystein HCl) *今回は1 % GOSを添加して行った
Transfer buffer	50 mM sucrose 1 mM ammonium citrate (pH 6.0)	0.5 M sucrose, 1mM ammonium citrate (pH 6.0)	10 % GOS / 1 mM ammonium citrate (pH 6.0)
抵抗(Ω)	200	200	200
kV / cm	10	15	12.5*今回は10
uF	25	25	25

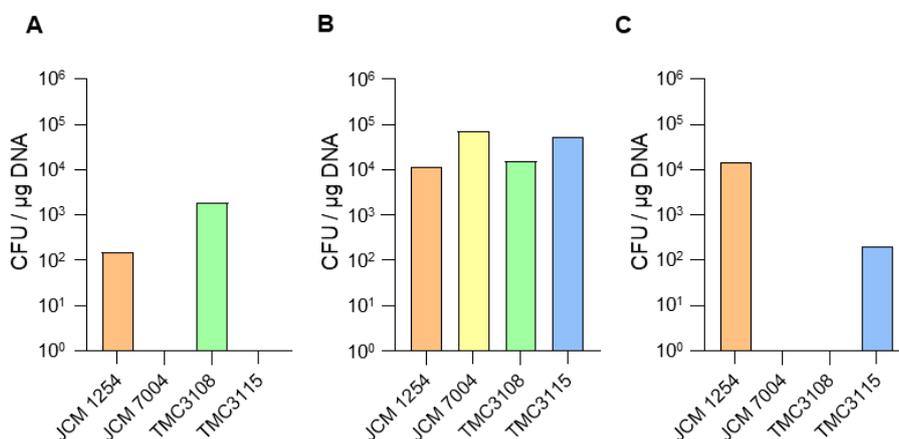


Figure II-10. 形質転換における条件検討

(A-C) Sakanakaらの方法(A)、Parkらの方法(B)、Serafiniらの方法(C)の形質転換効率を示す($n=1$)。

3種の欠損株(BbhI⁻, BbhIV⁻, BbhV⁻)と1種の二重欠損株(BbhI⁻/BbhIV⁻) (Figure II-3)を作製し、成長曲線下面積(AUC)を比較してその増殖能を調べた(Figure II-11)。その結果、Lacを糖源とした際の増殖は野生型(wild type : WT)株、BbhI⁻株、およびBbhIV⁻株の間で ± 1.1 倍程度の差であったが、PGMを炭素源とした場合においては、BbhIV⁻株はWT株と

比較して成長遅延が観察され、そのAUCはWT株の73%であった。BbhI株のPGMでの増殖は、WT株の93%程度で大きく変化しなかった。また、LacおよびPGM上で生育したBbhV株のAUCは、WT株と比較してそれぞれ83%および120%であった。これらの結果より、BbhIVが*B. bifidum*のムチン糖鎖の分解および資化能に大きく関与していることが示唆された。さらに、*bbhI*および*bbhIV*を欠損させたBbhI⁻/BbhIV⁻株については、Lac添加培地で培養した場合の増殖能はWT株と同程度であったが、PGMで培養した際のAUCはWT株の51%にまで減少し、BbhIV⁻株(BbhIV単独破壊株)と比較しても減少した。このことは、*B. bifidum*によるPGMのO-結合型糖鎖分解の効率的な分解にはBbhIとBbhIVの両方が重要な役割を果たしていることを示唆している。

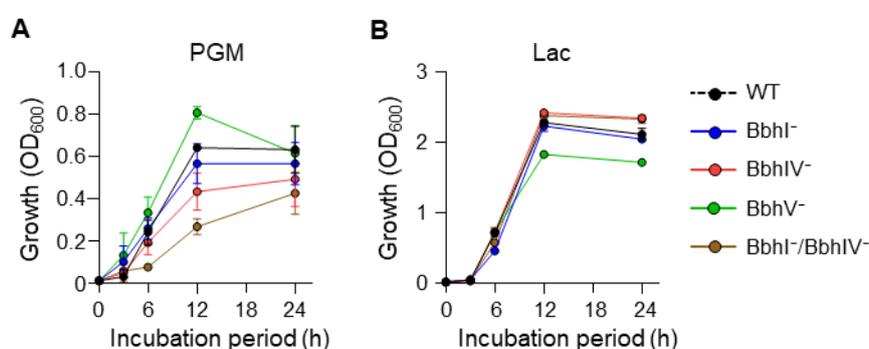


Figure II-11. 各遺伝子変異株をPGM またはLactoseで培養した時の生育曲線
0.5% PGM (A)またはLac (B) を添加したmMRS培地での*B. bifidum* JCM 1254のWT株 および欠損株 (BbhI⁻、BbhIV⁻、BbhV⁻、BbhI⁻/BbhIV⁻) の増殖 ($n = 3$ 、平均 \pm SD)。

次に、24時間培養後の培養液から抽出したPGMのO-結合型糖鎖の網羅的分析を行った。Figure II-2およびTable II-3で示した通り、*B. bifidum*はムチンO-結合型糖鎖に作用する様々なGHを細胞壁に有しているため、BbhI、BbhIまたはBbhVを欠損させた場合には、欠損させた酵素以外のGHが糖鎖構造を限界までトリミングする。つまり、消費されずに残った糖鎖構造が、BbhI、BbhIまたはBbhVの基質であることになる。その結果、予想した通り得られたMSスペクトルは菌非添加のコントロールサンプルと*B. bifidum*を添加培養したサンプルとの間で異なるパターンを示した(Figure II-12、Supplementary Table S3)。回収されたPGM重量当たりのO-結合型糖鎖の推定総量を比較すると、菌非添加コントロールサンプルではPGM 100 μ gあたり41.2 nmolであったのに対し、*B. bifidum* WT株を培養したサンプルではPGM 100 μ gあたり10.1 nmolと減少した(Figure II-13A)。このWT株の培養液から得られたPGM O-結合型糖鎖の推定総量は、BbhV⁻株培養後のPGMから得られた糖鎖総量と同程度であった(PGM 100 μ gあたり9.5 nmol) (Tukey's multiple comparisons test)。一方、BbhIV⁻株およびBbhI⁻/BbhIV⁻株を添加して培養後に回収したPGMにおいては、WT株を培養した際のPGMよりも多くのムチンO-結合型糖鎖が分解さ

れずに残っており、それぞれ100 μg PGMあたり19.1 nmolおよび19.0 nmolであった。BbhI株の培養後のサンプルでは、100 μg PGMあたり14.8 nmolのムチン糖鎖が残っており、これはWT株とBbhIV株で観察された推定総糖鎖量の間程度であった($p = 0.1174$)。これらの菌株の糖鎖分解能の違いは、増殖の際に観察された差を良く反映したものと考えられる(Figure II-11A)。

続いて、FDR補正後データを使用して volcano plot を行い、3つの β -N-acetylglucosaminidase をそれぞれ欠失させることで存在量に変化する糖鎖分子種を特定した (Figure 13B)。BbhI株、BbhIV株、およびBbhI/BbhIV株の培養後には、それぞれの変異株において、 m/z 779のみの1つのインピーク、 m/z 779、1199、1229、および1519

Table II-3. *B. bifidum*由来ムチンO-結合型糖鎖に作用する細胞壁アンカー型加水分解酵素

Enzyme	GH	Gene name	Linkage to be hydrolyzed
Lacto-N-biosidase	GH20	<i>lnbB</i>	β -Linked lacto-N-bioside (Gal β 1,3GlcNAc β 1-O-R) and galacto-N-bioside (Gal β 1,3GalNAc β 1-O-R)
β -N-Acetylhexosaminidase	GH20	<i>bbhI</i>	β -Linked N-GlcNAc
1,2- α -L-Fucosidase	GH95	<i>afcA</i>	α 1,2-Linked L-fucoside (specific for H-antigen Fuca1,2Gal)
Sialidase/esterase	GH33	<i>siaBb1</i>	α -Linked sialic acid/O-acetyl sialic acid
Sialidase	GH33	<i>siaBb2</i>	α -Linked sialic acid (prefers α 2,3 over α 2,6 linkages)
1,3/1,4- α -L-Fucosidase	GH29	<i>afcB</i>	α 1,3/1,4-Linked L-fucoside in Lewis structures (branched Gal is required)
β -Galactosidase	GH2	<i>bbgIII</i>	β -Linked galactoside (hydrolyzes type-2 chain and Lac, but not type-1 chain)
α -N-Acetylglucosaminidase	GH89	<i>agnB</i>	α -Linked N-acetylglucosaminide (specific for GlcNAc α 1-4 Gal)
β -SO ₃ -N-Acetylhexosaminidase (sulfoglycosidase)	GH20	<i>bbhII</i>	β -Linked 6-sulfated N-acetylhexosaminide
α -Galactosidase	GH110	<i>agaBb</i>	α -Linked galactoside of Blood group substance-B
Endo- α -N-acetylgalactosaminidase homolog (Q3T552, <i>B. longum</i>)	GH101	<i>engBF</i>	α -Linked galacto-N-bioside (Gal β 1,3GalNAc α 1-O-R, T-antigen)(not empirically supported)

の4つのイオンピーク、 m/z 1403、1519、1648、および2475の4つのイオンピークの推定糖鎖量がWT培養後のサンプルに比べ増加した。また、BbhV株を培養した際には、 m/z 1345のイオンピークの推定糖鎖量がWT株を培養した際より減少した。菌非添加コントロールサンプルに由来する m/z 779のピーク(Hex1HexNAc1GalNAc-itol)のMS/MSフラグメント解析を行ったところ(Figure II-14A)、本ピークには4種類の異性体(アイソマー糖鎖分子種)、すなわち、末端に α -または β -結合GlcNAcを持つcore 1構造(core 1 trisaccharide *a/b*)、core 2 trisaccharide、または末端にGalを持つcore 3 trisaccharideが含まれている可能性が考えられた(Figure II-14B)。なお、PGMのO-結合型糖鎖の非還元末端における α -GlcNAcあるいは β -GlcNAc残基の存在は既に報告されている(46, 73)。菌添加サンプルに由来する m/z 779のピーク(Hex1HexNAc1GalNAc-itol)についてMS/MS分析を行ったところ、*B. bifidum*を培養したサンプル間で異なるフラグメントパターンが得られた(Figure II-14A)。菌非添加コントロールサンプルでは、 m/z 504と520の2つのフラグメントイオンが最も多く検出され、次いで m/z 543ピークであったため、この親イオンピークには主にcore 1構造を構成する糖鎖が含まれることが示唆された。しかし、BbhIV株で培養したサンプルでは、 m/z 543のフラグメントイオンが優勢となり、次いで m/z 520のピークが現れた。 m/z 543のフラグメントイオンはcore 2およびcore 3 trisaccharideからは生成するが、core 1の構造からは生成しない。また、 m/z 520のフラグメントイオンはcore 3 trisaccharideからは生成されない。したがって、BbhIV株の培養後に分解されずに残った m/z 779のピークはcore 2 trisaccharideを多く含んでいることが示唆された。BbhI株を培養したサンプルでは、core 1およびcore 2 trisaccharideから生成される m/z 520のフラグメントイオンが優勢となり、次いで m/z 504と m/z 543のピークが出現した。この結果は、BbhI株培養後のPGMに付加しているムチンO-結合型糖鎖には、core 1 trisaccharideの*a*と*b*のいずれか、あるいは両方がほとんど分解されずに残っていることを示唆している。ここで、core 1 trisaccharide *a*の α -GalNAcは、*B. bifidum*において既に同定されている α -N-acetylgalactosaminidase (AgnB)によって分解されるであろうことを考慮すると(46)、この親イオンにはcore 1 trisaccharide *b*が主に含まれている(分解されずに残されている)可能性が高いと考えられた。BbhV株培養後のPGMから得られた m/z 779のピークのフラグメントパターンは、WT培養後に得られたものと同じであり、このことからBbhVがO-結合型糖鎖の分解にはそれほど関与していないことが示唆された。また、BbhI/BbhIV株では m/z 779のピークがBbhIVと同程度に蓄積していた(Figure II-14CおよびSupplementary table S3)。BbhVは、ムチンO-結合型糖鎖中に存在するLacNAcユニットを連結するGlcNAc β 1-3Gal結合を加水分解できると考えられるため(Figure II-6F)、BbhIの分解能が欠失された場合においても、その活性はBbhVによって一部補われた可能性も考えられる。

さらに、BbhIV株の培養液で推定量が増加した m/z 1229のピークのMS/MS分析を行っ

た(Figure II-15)。その結果、core 1およびcore 3 pentasaccharideのみから得られる m/z 953のフラグメントイオンが検出されず、core 2 pentasaccharide *b*から得られる m/z 543と708のフラグメントイオンが見られたことから、やはりBbhIVが β -(1 \rightarrow 6)結合したGlcNAcの遊離を担うことが示唆された。core 4 pentasaccharideも m/z 543と708のフラグメントイオンを生成しないため、イオンピーク m/z 1229においてはcore 2 pentasaccharide *b*が分解さ

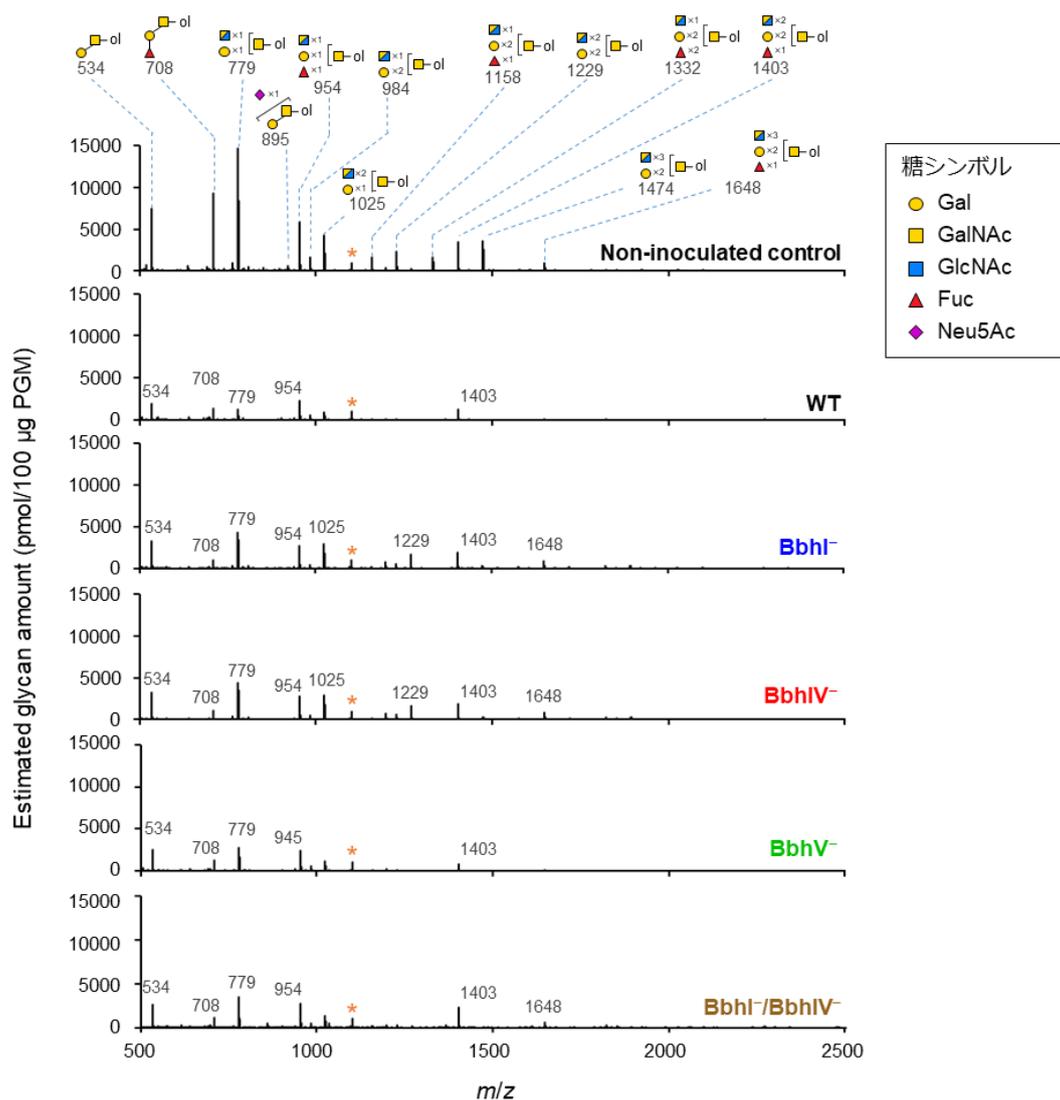


Figure II-12. *B. bifidum* 培養後のPGMから得られた完全メチル化O-結合型糖鎖アルジトール体のMSスペクトル

B. bifidum WT株、Bbhl⁻株、BbhIV⁻株、BbhV⁻株、およびBbhl⁻BbhIV⁻株と24時間培養した後のPGMから得られる完全メチル化O-結合型アルジトール体のMSスペクトル(m/z 500–3000)。菌を培養していないコントロールも示す。また、*は、半定量のために添加されたlacto-*N*-fucopentaose I (LNFP I, m/z 1100.6 [M + Na]⁺)のピークを示す。糖シンボルは、The Nomenclature Committee of the Consortium for Functional Glycomicsに従った(47)。

れずに残っていたと推察できる(Figure II-15)。WT株と比較して単一欠損株および二重欠損株の培養で存在量が著しく変化したその他のイオンピークについては(Figure II-13B)、糖組成が複雑なために構造を推定するのが困難である、もしくは糖鎖量が少なかったため、それ以上の解析を行うことは出来なかった。

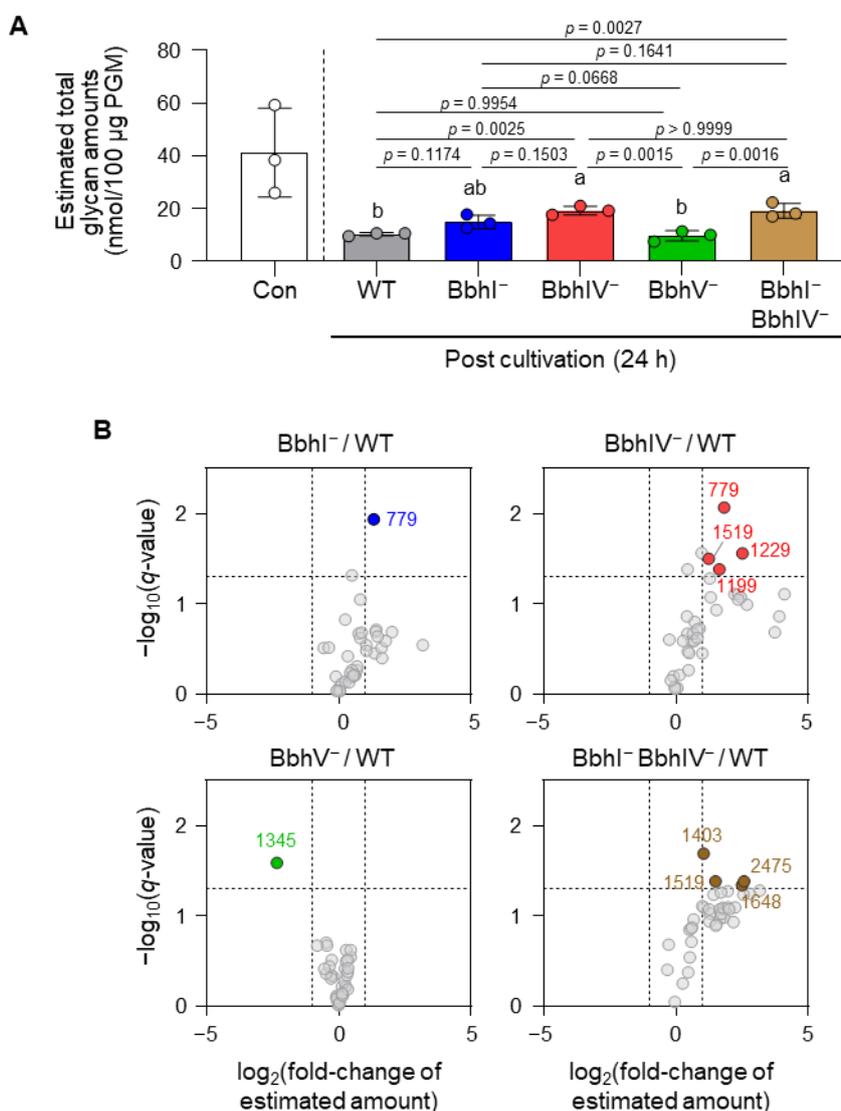


Figure II-13. *B. bifidum* WT株、Bbhl⁻株、BbhIV⁻株、BbhV⁻株、およびBbhl⁻/BbhIV⁻株のPGM O-結合型糖鎖の分解能

(A) *B. bifidum*の野生株および欠損株を24時間培養し後に回収したPGMから得られた O-結合型糖鎖の推定総量($n=3$ 、平均 \pm SD) (糖鎖組成と推定量は、Supplementary Table S3に記載)。One-way ANOVAとTukey's multiple comparison testにて統計解析を行った。aとbは、グループ間の有意差を示している ($p < 0.05$)。統計解析する際には菌を添加しなかったコントロールサンプルは除いた。

(B) Bbhl⁻株、BbhIV⁻株、BbhV⁻株、Bbhl⁻/BbhIV⁻株の培養後のPGMサンプルから得られた各O-結合型糖鎖の推定量とWT培養後の推定糖鎖量を比較するvolcano plot。倍率変化とその q 値をプロットに使用して、量が2倍以上変化し、 q 値が0.05未満のピークを色付けした。 q 値はmultiple t -testおよびFDR補正で得られた p 値であり(74)、有意に増加したピークの m/z 値を示した。

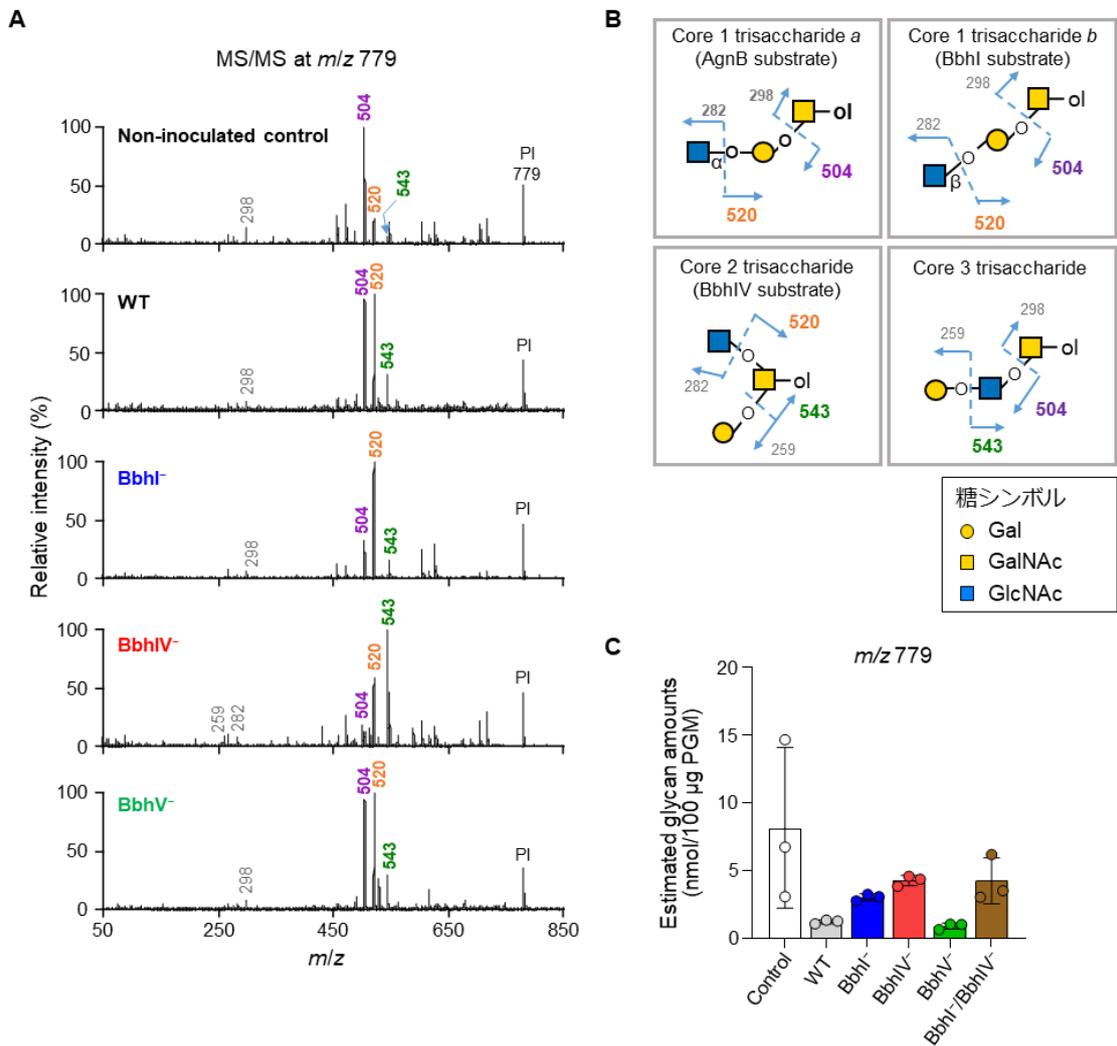


Figure II-14. 各*B. bifidum*株培養後の親イオンピーク m/z 779のMS/MS解析
 (A) *B. bifidum* JCM 1254 (WT株、BbhI株、BbhIV株、BbhV株、BbhI-/BbhIV株)培養後のPGM糖鎖解析で得られた親イオンピーク m/z 779 [precursor ion (PI)]のMS/MSスペクトラム。(B)フラグメントパターンから予想される4つの異性体構造。(C)イオンピーク m/z 779における推定糖鎖量。糖シンボルは、The Nomenclature Committee of the Consortium for Functional Glycomicsに従った(47)。

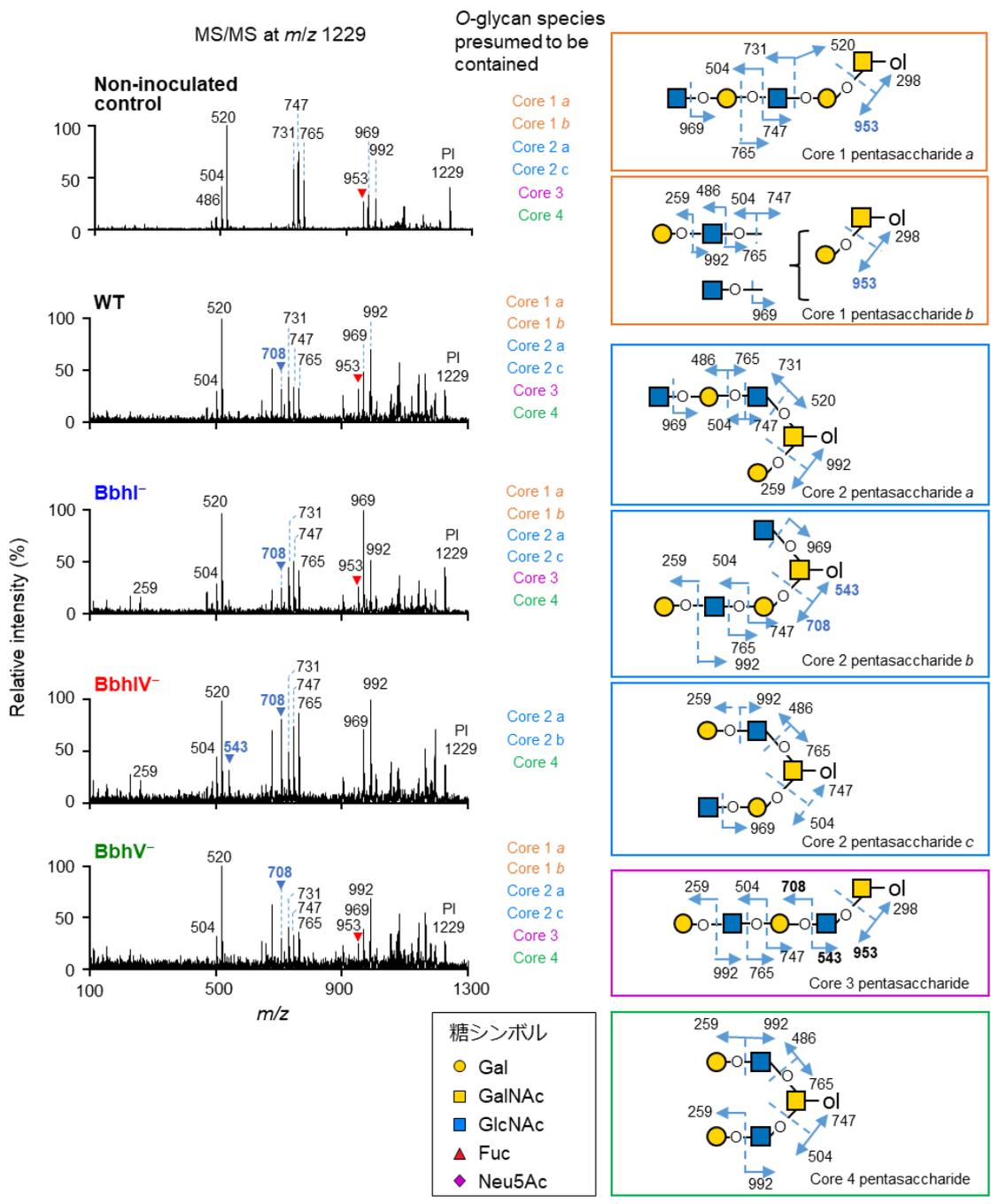


Figure II-15. 各*B. bifidum*欠損株培養後の親イオンピーク m/z 1229のMS/MS解析
 各*B. bifidum*欠損株を培養したPGMからの糖鎖分析から得られた親イオンピーク m/z 1229 (PI)のMS/MS解析を行った。フラグメントパターンから考えられる構造異性体は右側に示しており、core構造によって枠の色を変えている。PIに含まれると考えられるムチンO-結合型糖鎖はMS/MSスペクトラムの右側に記した。糖シンボルは、The Nomenclature Committee of the Consortium for Functional Glycomicsに従った(47)。

ムチンcore 4構造の分解はBbhIVとBbhIの順序だった協調的作用で生じる

*B. bifidum*によるムチンO-結合型糖鎖の分解においてはBbhIとBbhIVが重要な役割を果たすことが明らかとなった(Figure II-13A, 13B, 14A, 14Cおよび15)。続いて、 β -(1 \rightarrow 3)-と β -(1 \rightarrow 6)-結合を有するGlcNAc残基が同じ糖に結合した糖鎖構造に対する2種の β -N-acetylglucosaminidaseの作用を調べた。Core 4-Thrと精製酵素をインキュベートしてTLC分析を行った結果、BbhIによるcore 4構造の β -(1 \rightarrow 3)-結合の分解は、core 3構造の同じ結合を分解するときよりも大きく遅延することがわかった(Figure II-6A vs. Figure II-16A)。一方で、 β -(1 \rightarrow 6)-結合を分解するBbhIVはcore 4-Thr構造からGlcNAcを効率よく遊離した。また、BbhVの β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc結合に対する活性は、BbhIVよりも弱かった(Figure II-6B)。これらのことから、分岐した2つのGlcNAc残基を持つO-結合型糖鎖の分解にはBbhIとBbhIVの協調的な作用が必要であり、BbhIVがはじめに β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAcに作用し、続いてBbhIが β -(1 \rightarrow 3)-GlcNAcを加水分解するという順序だった分解が必要であることが示された(Figure II-16B)。

上記で行った欠損株を用いたPGM糖鎖分解能の解析において、*m/z* 820イオンピーク(HexNAc2-GalNAc-itol)の推定量をサンプル間で比較したところ、BbhIV株でのみ顕著な蓄積が検出された(Figure II-16C)。糖鎖存在量が少ないために、MS/MSフラグメント解析は出来なかったが、おそらくBbhIV株の培養後にcore 4 trisaccharideが蓄積したと推察される。未処理コントロールサンプルの*m/z* 820イオンピークの糖鎖は、*N,N*-diacetylactosamine構造(GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr) (73)である可能性が高い。この構造は、これまで解析されている*B. bifidum*が持つ保有する全ての細胞外GH酵素で分解されないため、コントロールサンプルおよびWT株培養後サンプル間でその推定量は変化しなかったと考えられた。BbhIV株を培養した場合、ムチン糖鎖は種々の分泌型GH酵素によってcore 4構造が露出されるまで分解されるものの、それ以上の分解が起こらなかったため、*m/z* 820のイオンピークが蓄積されたと推測できる。BbhI株やBbhI/BbhIV株ではcore 4構造が露出するまで分解が進まなかったため、*m/z* 820イオンピーク量がBbhIV株を培養したサンプルよりも少なかったと考えられる。

BbhIおよびBbhIVの二重欠損は*B. bifidum*のクロスフィーディング能に影響を及ぼす

*B. bifidum*は糖鎖を細胞壁アンカー型酵素で分解するが、その際に細胞外で生じた単糖および二糖の一部を他の腸内細菌にクロスフィードすることが知られている(75)。そこで、上述した*bbhI*、*bbhIV*、および*bbhV*の遺伝子欠損が*B. bifidum*のムチン糖鎖からのGlcNAc遊離能に与える影響を調べることにした。なお、一部のグリコシド結合は加熱により分解されやすいことが知られているため、反応を止める際に単糖が遊離しない加熱条件を検討した。80 °C、90 °C、もしくは95 °Cにて、それぞれ3分、5分、10分間加熱した後に、HPAEC-PADで上清中の単糖を調べた(Figure II-17A, 17B、および17C)。その

結果、Gal、GlcNAc、GalNAcはいずれの条件でも遊離しなかったが、Fucはわずかに、Neu5Acは95°Cでよく遊離した。また、90°CにおいてもNeu5Acの遊離が観察された。そこで、最も遊離度合いの少なかった80°C、3分の加熱処理にて反応を停止させることとした。

WTおよび各欠損株の細胞懸濁液をPGM存在下でインキュベートし、決定した加熱条件にて反応を停止させ、上清に遊離する単糖を定量した(Figure II-18)。Lacto-*N*-biosidase (LnbB)によって切り出されるlacto-*N*-biose I (LNB, Gal β 1-3GlcNAc)はアルカリ性条件下で極めて不安定であるために、HPAEC-PAD法では測定不可能であった(76)。なおインキュベートの際には、*B. bifidum*自身による遊離糖の消費を避ける目的でH⁺脱共役剤(carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone)およびABCトランスポーター阻害剤(verapamil)を添加した。

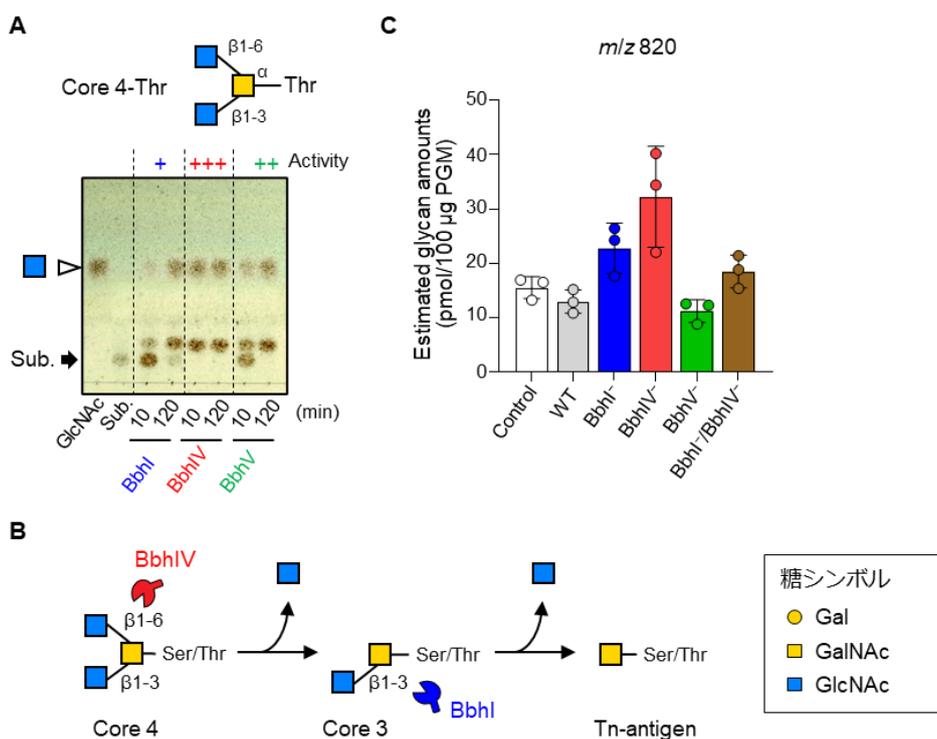


Figure II-16. BbhIおよびBbhIVによる順序だつて作用することでcore 4構造は分解される (A)反応溶液のTLC解析。基質であるcore 4-Thr (4 mM)を、精製酵素(1 μ MのBbhIまたはBbhIV)と10分または120分インキュベートした。 \rightarrow は基質を示し、標品としてGlcNAcを用いた。(B)推定される*B. bifidum*によるムチンcore 4構造の分解スキーム。はじめに β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAcがBbhIVによって分解されたのちに β -(1 \rightarrow 3)-GlcNAcがBbhIによって分解される。Tn抗原は、細胞内に取り込まれると考えられるが、トランスポーターは未同定である(33)。(C)各*B. bifidum*株培養後のPGM糖鎖構造解析から得られたイオンピーク*m/z* 820 (HexNAc2GalNAc-itol)の推定糖鎖量。糖シンボルは、The Nomenclature Committee of the Consortium for Functional Glycomicsに従った(47)。

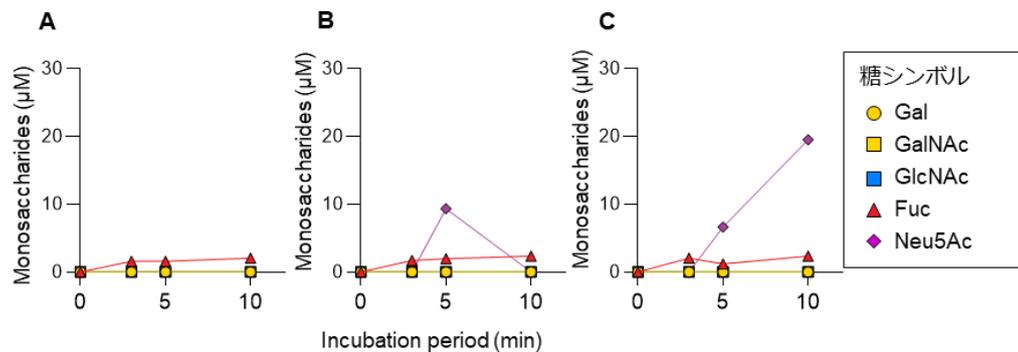


Figure II-17. 単糖が遊離しない加熱条件の検討

80 °C (A)、90 °C (B)、および95 °C (C)にて、それぞれ3分、5分、10分間加熱処理した時の、溶液中の単糖($n = 1$)。糖シンボルは、The Nomenclature Committee of the Consortium for Functional Glycomicsに従った(47)。

その結果、FucとNeu5Acの遊離はいずれの β -*N*-acetylglucosaminidaseの遺伝子欠損による影響を受けなかったが、Galの遊離はBbhI/BbhIV株でわずかに減少していた(Figure II-18)。GlcNAcの遊離能は欠損株ごとに顕著に異なっており、BbhIV欠損によってWT株の半分にまで低下し、120分後の濃度はWT株で0.80 mMであるのに対しBbhIV株では0.39 mMであった(Figure II-18)。BbhI株でもGlcNAcの遊離能の低下は観察された、120分後の濃度は0.61 mMであった。一方、BbhVにおいては大きな変化は見られなかった(Figure II-18)。GlcNAc遊離能の低下が最も大きかったのはBbhI/BbhIV株あり、そのGlcNAcの遊離活性は、WTの10分の1であった (120分後に0.085 mM)(Figure II-18)。これらの結果は、PGMを炭素源として使用した際の、WT株と各変異株の増殖試験の結果、およびBbhI/BbhIV株処理サンプルにおいてより多くの、また重合度の高い糖鎖が残されていたデータと一致していた(Figure II-11および13B)。また、GalNAcは検出されなかったが(Figure II-18)、これは*B. bifidum*において細胞外*N*-acetylgalactosaminidase活性が報告されていないことと一致している。

次に、BbhIおよびBbhIVによるムチン糖鎖からのGlcNAc遊離が*B. bifidum*のクロスフィーディング能に与える影響について検討した。すなわち、*B. bifidum* WT株もしくはBbhI/BbhIV株を、PGM添加培地では単独で生育することができない*Bifidobacterium breve* JCM 1192^Tと共培養し、経時的に*B. breve*のCFUを算出することでクロスフィーディング能を調べた(Figure II-19A)。なお、*B. breve*はムチン糖鎖の構成単糖混合物(Fuc、Gal、GlcNAc、GalNAc、およびNeu5Acを各0.2%)の添加培地では良く増殖し(Figure II-19B)、培養24時間後にはFucとNeu5Acを完全に、GlcNAcは50%程度、Galは25%程度消費した(Figure II-19C)。GalNAcの利用は観察されなかった。

*B. bifidum*と*B. breve*の共培養では、培地中にTetを添加することで*B. bifidum*を静菌状態とする一方で(77)、*B. breve*にはTet耐性遺伝子を持つプラスミドを導入して増殖可能とした。これは、*B. bifidum*のWT株とBbhI/BbhIV株の間で培養中の菌体量に差が生じることによる*B. breve*への影響を除くためである(Figure II-11A)。すなわち、*B. breve*の増殖は*B. bifidum* WT株とBbhI/BbhIV株が有する糖分解物遊離能のみに依存することになる。その結果、*B. bifidum* WT株との共培養時には*B. breve*はよく増殖し、培養上清中のFuc、Neu5Ac、およびGlcNAcの時間依存的な消費が観察された(Figure II-19D)。*B. bifidum*はFucおよびNeu5Ac資化経路をゲノム上に保有せず、それらを資化することができないため(43, 48, 69, 78)、*B. breve*の増殖は*B. bifidum*を介したクロスフィーディングによるものであることが強く推察された。遊離GlcNAcについては、そのほとんどが*B. breve*によって利用されたと考えられるが、静菌状態にある*B. bifidum*が一部のGlcNAcを代謝した可能性も否定はできない。Galに関しては、培地中への経時的な蓄積が観察された(Figure II-19D)。*B. breve*および*B. bifidum*のゲノム上にはGalトランスポーターホモログが存在していないため、ほとんど資化することが出来なかったと考えられる(69, 79)。

一方でBbhI/BbhIV株と共培養した場合、*B. breve*のCFUはWT株と共培養した際の61%にまで減少した(Figure II-19A)。BbhI/BbhIV株は、ムチン糖鎖からのGlcNAc遊離活性が低く(Figure II-18)、共培養培地中におけるGlcNAc濃度は常に無視できる程度であっ

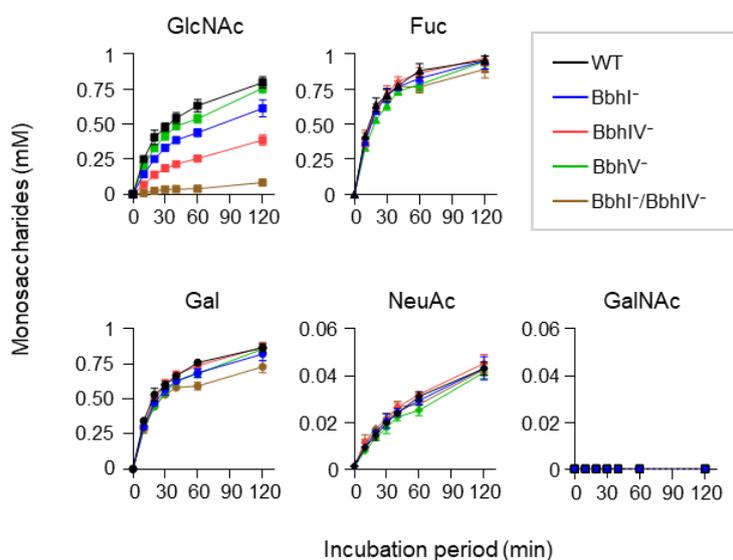


Figure II-18. BbhIおよびBbhIVの欠損はムチン糖鎖からのGlcNAc遊離能を低下させる *B. bifidum* JCM 1254 (WT、BbhI⁻、BbhIV⁻、BbhV⁻、およびBbhI⁻/BbhIV⁻株)をインキュベートした際の経時的な単糖の遊離。化学的にエネルギーを枯渇させた*B. bifidum*を0.5% PGMを含む溶液でインキュベートした($n=3$ 、平均 \pm SD)。

た。培地中の他の単糖については、*B. bifidum* WT株と共培養した場合と同程度の濃度であったが、Fuc濃度については培養初期に一時的に高くなった。これは、*B. breve*の増殖速度がその時点で遅かったためであろう。Tetを添加して静菌状態においた*B. bifidum*の菌体量が共培養中のWT株とBbhI⁻/BbhIV⁻株間で差がなかったと仮定すると、*B. breve*の増殖能の低下は、BbhIおよびBbhIVの欠失によって生じたGlcNAc遊離能の低下が原因であると考えられる(Figure II-20)。

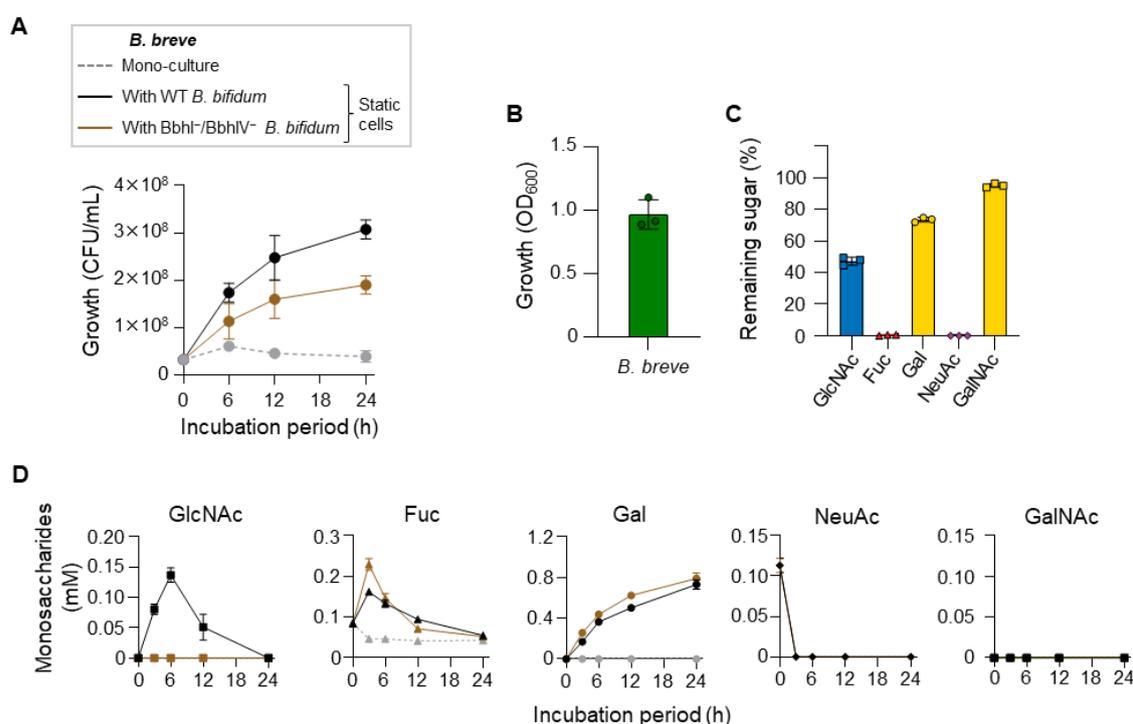


Figure II-19. BbhIおよびBbhIVの欠損は*B. bifidum*のクロスフィーディングに影響を与える (A) PGMを含む培地中での*B. breve*の増殖($n = 3$)。 *B. breve*を単独で(グレーの点線)、もしくは*B. bifidum* WT株(黒線)またはBbhI⁻/BbhIV⁻株(茶線)と共培養した。Tetを培地に添加することで*B. bifidum*を静止状態にした。また、*B. breve*にはpMSK219を導入することでTet^Rとした。(BおよびC) ムチン糖鎖構成単糖(GlcNAc, Fuc, Gal, Neu5Ac, およびGalNAc: 各0.2%)を糖源とした際の*B. breve*の増殖。(B) 24時間インキュベート後のOD₆₀₀値。初期OD₆₀₀は0.01とした。(C) 24時間培養後の単糖の残存割合。糖はHPAEC-PADを用いて定量した。平均 ± SDを示す。(D) *B. breve*の単独培養もしくは*B. bifidum* WT株またはBbhI⁻/BbhIV⁻株との共培養時の培地上清中ムチン糖鎖構成単糖の定量。糖シンボルは、The Nomenclature Committee of the Consortium for Functional Glycomicsに従った(47)。

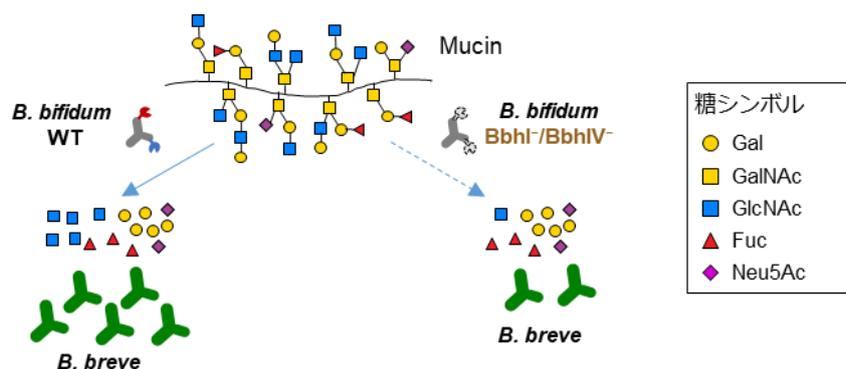


Figure II-20. BbhIおよびBbhIVは*B. bifidum*によるムチン糖鎖からのGlcNAc遊離およびクロスフィードリング能に関与する

GH84酵素の系統樹解析

細菌による宿主糖鎖分解にGH84酵素が関与していることを示した例は、著者の知る限りは初めてであった。そこで、これまでに酵素学的解析がなされているGH84ホモログの触媒ドメインのアミノ酸配列を使用した系統樹解析を行うことにした(49, 65)。この際、*B. bifidum*以外にムチン分解能を有することが報告されているいくつかの腸内細菌種、すなわち*Akkermansia muciniphila*および*Bacteroides*属細菌のホモログも解析に含めた(Figure II-21)。その結果、ホモログ間において配列多様性が高いことが明らかになり、系統樹上では3つの異なる群(クレードI、II、およびIII)に分類された。それぞれの相同性はSupplementary Table S4に記載した。クレードIIは、翻訳後修飾を受けたタンパク質O-GlcNAcに作用する真核生物由来のホモログを中心に構成されており、同様の活性が報告されている*Streptococcus pyogenes*および*Thermobaculum terrenum*由来のホモログも含まれていた(80, 81)。23 - 64 %の相同性を持つ*Clostridium perfringens*の4つのパラログはクレードIIまたクレードIIIのどちらかに分類された。クレードIIは*B. bifidum*および*C. perfringens*由来の酵素で構成され、主に宿主糖鎖の分解に関与するβ-N-acetylglucosaminidaseから構成されると推察された。*C. perfringens*のNagHはタンパク質O-GlcNAcに作用することが報告されているが(49)、*C. perfringens*はムチンを糖源として増殖することが*in vitro*で報告されており、BbhIVと同様の機能を有することが推察された(82)。クレードIIIには、*Bacteroides*属細菌、*A. muciniphila*、および*C. perfringens*のホモログが含まれており、これらホモログにはβ-N-acetylglucosaminidase活性およびタンパク質O-β-N-acetylglucosaminidase活性の両方が報告されている。以上のことから、GH84酵素は微生物間のみならず宿主-微生物間の水平伝搬を通じて多様化し、さまざまな活性を獲得したことが推察された。

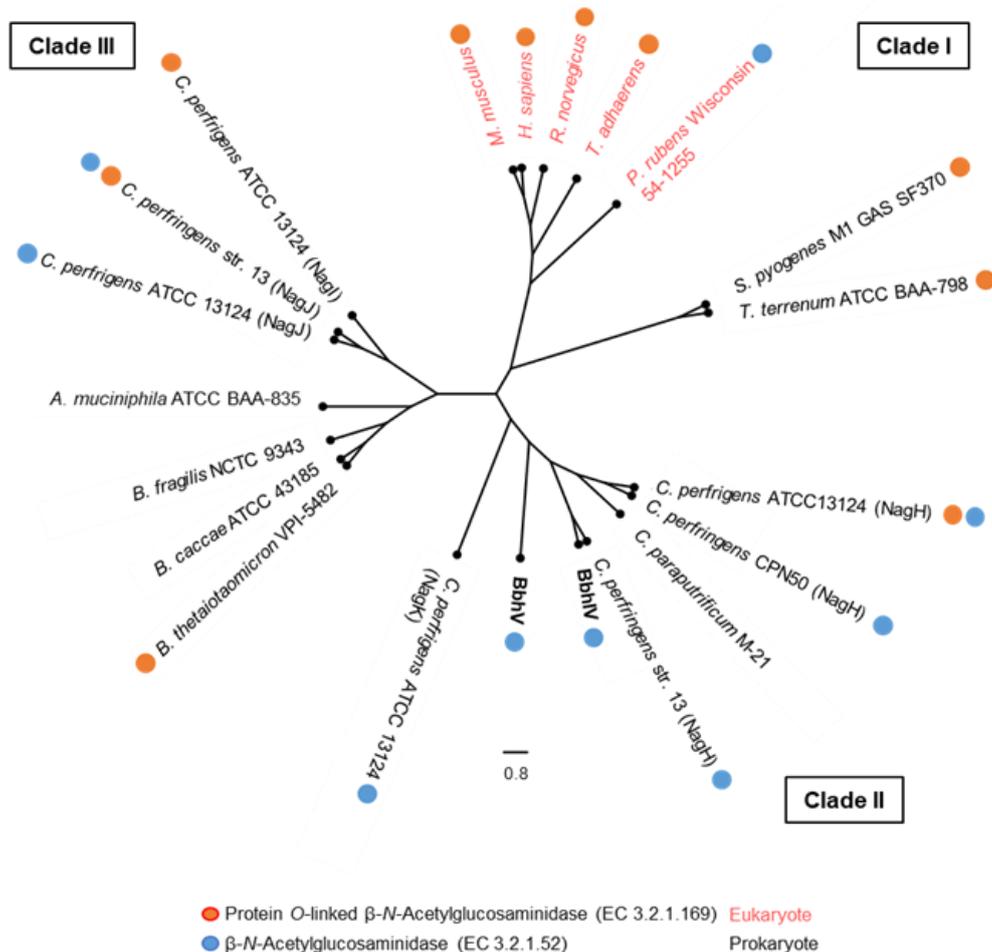


Figure II-21. GH84触媒ドメインの系統樹

系統樹は、これまでに性状解析されたGH84酵素の触媒ドメイン、*B. bifidum*由来のBbhIVおよびBbhVの触媒ドメイン、また機能未解析ではあるがムチン資化性を有することが報告されている細菌由来のGH84ホモログの触媒ドメインを用いた。用いたホモログのUniProt IDsは以下に示す: AAH39583.2 (*Homo sapience*), AAG43273.2 (*Mus musculus*), CAP80500.1 (*Penicillium rubens* Wisconsin 54-1255), AAK72103.1 (*Rattus norvegicus*), AKA09674.1 (*Trichoplax adhaerens*), AAO79500.1 (*Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482), BAC99989.1 (*Clostridium paraputrificum* M-21), ABG83307.1, ABG84510.1, ABG84519.1, and ABG84775.1(*Clostridium perfringens* ATCC 13124), AAA23259.1 (*Clostridium perfringens* CPN50), BAB79897.1 and BAB80940.1 (*Clostridium perfringens* str. 13), AAK34378.1 (*Streptococcus pyogenes* M1 GAS SF370), ACZ41038.1 (*Thermobaculum terreum* ATCC BAA-798), ACD03898.1 (*Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835), ASM65960.1 (*Bacteroides caccae* ATCC 43185), CAH09476.1 (*Bacteroides fragilis* NCTC 9343), GJM46876.1 (BbhIV), GJM47429.1 (BbhV)。触媒ドメインはProtein Families Databaseで同定した(66)。アライメントにはClustal Omega(67)を使用し、FigTree v1.4.4を用いて系統樹を作成した。報告されている活性として、タンパク質O-β-N-acetylglucosaminidaseは●で、β-N-acetylglucosaminidaseは●で示した。真核生物は紫、細菌は黒の文字で記した。それぞれのホモログの相同性はSupplementary Table II-S4に記載した。

考察

本研究では、*B. bifidum*の3つの細胞膜アンカー型 β -*N*-acetylglucosaminidaseに注目し、異なる基質特異性を持つBbhI (GH20)とBbhIV (GH84)がムチン*O*-結合型糖鎖の分解に重要な役割を果たすことを示した。BbhIは消化管に広く存在するcore 3構造の β -(1 \rightarrow 3)-GlcNAc結合を加水分解するのみならず(31)、おそらく伸長した糖鎖のLacNAcユニットの β -(1 \rightarrow 3)-GlcNAc結合の加水分解にも関与していると考えられる。一方、BbhIVは、遠位結腸と回腸にそれぞれ見られるムチンcore 2とcore 4構造の β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc結合の加水分解を担うことが明らかとなった。おそらく、糖鎖内部の分岐点に存在する β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc結合も加水分解すると考えられる(31)。さらに、 β -(1 \rightarrow 3)-および β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc残基の両方を持つ分岐した*O*-結合型糖鎖を効率的に分解するには、BbhIVとBbhIが順序だてて作用することが必要であることも明らかとなった(Figure II-16)。BbhIV株は、BbhI株およびBbhV株よりも多くのムチン糖鎖を分解できずに残していた(Figure II-13A)。これは、PGMにcore 2構造が多く含まれるだけでなく、BbhIがcore 4構造に殆ど作用できなかったのと同様、分岐 β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc残基が存在する場合に β -galactosidaseなどの他の酵素も*O*-結合型糖鎖をそれ以上切断できなかったためだと考えられる(Figure II-15および16A)。また、BbhI/BbhIV株で残された糖鎖の分子量は比較的大きかったため(Figure II-13)、糖鎖伸長の途中の分岐鎖 β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAcやLacNAcユニットが分解できなかったためだと考えられる。しかし、統計解析において有意に増加した糖鎖種についてはその存在量が少なかったため、BbhI/BbhIV株とBbhIV株ではその残存糖鎖量が同程度であったと考えられる。

*B. bifidum*によるGlcNAc遊離能は、BbhI株、BbhIV株、およびBbhI/BbhIV株間で異なっていた(Figure II-16)。しかしながら、FucおよびNeu5Acの遊離能に変化はなかった(Figure II-16)。これは、FucおよびNeu5Acによる糖鎖修飾が糖鎖の非還元末端側で見られるためである。一方、Gal遊離能は二重欠損株においてわずかに低下していた。これは、BbhIおよびBbhIVの欠損がPGMムチン糖鎖構造におけるLacNAc unitの分解にわずかに影響を与えたためかもしれない(73)。ただし、前述したようにBbhVはBbhIの欠損を部分的に相補している可能性もある。また、各欠損株のPGMでの増殖能は、GlcNAc遊離能の結果を反映し、二重欠損株において最も低下していた(Figure II-11A)。FucおよびNeu5Acの遊離能は株に共通しており、GlcNAc分解のみの差でこのような違いが見られたことは、*B. bifidum*のムチン資化においてBbhIおよびBbhIVは重要な役割を果たすと考えられる。また、二重欠損株では*B. breve*との共培養実験で示したように他の微生物へのクロスフィーディング能も低下しており(Figure II-19A)、BbhIおよびBbhIVによって放出されるGlcNAcは菌叢全体の形成に関与していることが推察された。クロスフィーディングは腸内細菌間において頻繁にみられ、例えば、植物細胞壁多糖のarabinogalactanではビフィズス菌と*Bacteroides*属細菌との間で、マンナンでは*Bacteroides*属細菌や

*Roseburia intestinalis*と*Faecalibacterium prausnitzii*との異種間でのクロスフィーディングが報告されている(7, 83)。クロスフィーディングは腸内細菌叢という生態系における栄養源獲得の戦略の一つであり、腸内細菌叢形成における重要な決定因子だと考えられる。

PGM培地で培養した際には、*bbhI*、*bbhII*、および*bbhIV*の転写量の上昇が確認された(Figure II-4Aおよび4B)。これは、*B. bifidum* PRL2010株のBBPR_1529 (BbhIホモログ)、BBPR_1018 (BbhIIホモログ)、およびBBPR_1514 (BbhIVホモログ)を含む様々なGH遺伝子が、PGMを炭素源とした際に発現上昇すると報告したTurroneらのトランスクリプトーム解析の結果と一致していた(55)。*B. bifidum*は、ムチンO-結合型糖鎖に加えてHMOsも利用可能であることが知られているが、HMOsの糖鎖構造はムチンO-結合型糖鎖と構造的に類似している(75, 84)。最近、Arzamasovらは、*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*においてROKファミリーの転写調節因子であるNagRが、GlcNAcを含むHMOsの利用を担う遺伝子の発現を制御していることを明らかとすると共に、*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*におけるNagR結合モチーフ配列を抽出した(85)。興味深いことに、*B. bifidum*の*bbhII*および*bbhIV*の上流領域にはNagR結合モチーフ様配列が存在している一方で、*bbhI*および*bbhV*遺伝子の上流領域には存在しなかった。このことを反映して、PGMによる転写誘導の変化率は*bbhII*と*bbhIV*の間で同様だった一方で、*bbhI*においては*bbhII*や*bbhIV*と比較して非常に高かった。また、*bbhV*ではあまり上昇しなかった(Figure II-4Aおよび4B)。したがって、*bbhII*と*bbhIV*はNagRに制御されている一方で、*bbhI*は*B. bifidum*の異なる調節因子の制御下にあると考えられた。

真核生物におけるシグナル伝達に関わるタンパク質のSer/Thr残基においてO- β -N-glucosaminilation (O-GlcNAcylation)が生じていることが発見され、さらにそれらの修飾タンパク質からの脱GlcNAcylationを担うGH84ホモログがヒトで同定されて以降(51)、GH84酵素は様々なシグナル伝達系においてタンパク質O-GlcNAc付加とリン酸化のバランスを調節する重要な酵素として注目されるようになった(52)。加えて、細菌が保有するGH84酵素が、哺乳動物由来細胞株から抽出したタンパク質O-GlcNAcに作用することが報告されて以降、GH84に関する研究はさらに加速した(86)。*A. muciniphila*および*B. thetaiotaomicron*由来のGH84酵素をビーズにコーティングしてマウスに経口投与すると、化学的に誘発させた腸炎が改善されることが報告され(87)、このことから、GH84酵素はタンパク質O-GlcNAc修飾の制御を通じて腸内細菌と宿主の間のクロストークを媒介する可能性が示唆された。その一方で、本研究では、GH84酵素が少なくとも*B. bifidum*においてはムチン糖鎖の分解に特化した酵素であること、また、その酵素活性がクロスフィーディングを介して腸内細菌叢の形成に関与することを示した。一部の細菌由来の細胞壁アンカー型GH84酵素は、宿主上皮細胞内のO-GlcNAc修飾、すなわちシグナル伝達

に影響を与えるかもしれないが、*B. bifidum*の細胞壁アンカー型のGH84であるBbhIVは、ムチン糖鎖分解のために独自に進化した可能性が考えられる。

BbhIVとBbhVのGH84触媒ドメインの相同性は52%であった。基質特異性は似ていたものの、BbhIVはBbhVよりもcore 2およびcore 4構造に対する高い活性を示した。両者の顕著な違いは、還元末端にThrまたはpNPを持つcore 2 trisaccharidesに対する活性において検出された(Figure II-6Bおよび6C)。これらの結果と遺伝子発現解析を合わせると、ムチン糖鎖分解は主にBbhIVによってのみ担われていると推察された。

GH84では、その初期の研究においてhyaluronoglucosaminidase活性をもつとされた研究もあったが、その報告は再確認されていない(80, 88)。所属研究室の加藤らは、*B. bifidum*はglycosaminoglycans (GAG)のうちkeratan sulfateは分解するもののhyaluronanなどのほかのGAGは分解できないと報告しているため(43)、BbhVがhyaluronanを基質とする可能性は低いと考えられた。BbhVは、コンプレックス型のN-結合型糖鎖[Neu5Ac α 2-6Gal β -4GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-N-Asn]中に存在するGlcNAc β 1-2Manを効率よく分解したことから、N-結合型糖鎖などの他の糖鎖の分解に関与している可能性もある。N-結合型糖鎖は、母乳中のタンパク質にも含まれ、immunoglobulinやlactoferinなどに結合している。成人の腸管ムチン層においてもMUC2にN-結合型糖鎖付加サイトが30カ所程度存在することが示唆されている(17, 89)。また、Lypd8などの腸管内に分泌される免疫物質にもN-結合型糖鎖は付加しており、基質としての可能性は考えられる。あるいは、HMOs中の分岐 β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAcの分解に関与しているかもしれない。上述した通り、*B. longum* subsp. *infantis*のGH20酵素(Blon_0732)はHMOsの β -(1 \rightarrow 6)-結合を加水分解できるが、*B. bifidum*のBbhI (GH20)はHMOsの β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc残基に作用できないため(42)、BbhVが代替している可能性がある。今後、BbhIVとBbhVの機能の違いを理解するには、構造に基づく変異体解析と分岐したN-結合型糖鎖や分岐鎖HMOsを用いたさらなる酵素解析が必要である。なお、BbhIVとBbhVの触媒ドメインをAlphaFold2で構造予測して、両者の(+)サブサイトを比較したが、明瞭な構造的差異を見出すことは出来なかった。

本研究は、腸内細菌によるムチン糖鎖分解戦略のうち、これまで知られていなかったGH84酵素によるcore 2およびcore 4構造への作用を明らかとした点で、また、その分解がクロスフィーディングに大きな影響を与えていることを示した点で重要な知見を与えたと考えている。GlcNAcは、細菌において炭素源としても窒素源としても機能するため、腸内細菌叢の形成には大きな影響を与えるであろう。また、本研究では、真核生物、腸内細菌、および宿主と腸内微生物の相互作用におけるGH84の水平伝播の可能性と機能の多岐化を示した点でも意義のあるものだと考えている(90)。

第三章 総合考察

これまでの多くの*in vitro*研究において、*B. bifidum*はムチン糖鎖の分解能を有することが示されてきたが、*in vivo*でのムチン分解活性については議論が分かれていた(91)。しかしながら、所属研究室の加藤らは*B. bifidum*を単独定着させたマウス腸内のムチン糖鎖を解析することで、*in vivo*でのムチン糖鎖分解活性を初めて実証した(43)。すなわち、*B. bifidum*の投与により盲腸内容物中のムチンO-結合型糖鎖構成単糖の濃度が増加する一方、糞便中のO-結合型糖鎖の量が減少した。さらに、*B. bifidum* WT株のみを定着させたマウスから得られた糞便中のO-結合型糖鎖構造と、著者が作出したBbhII株を定着させたマウス糞便中のO-結合型糖鎖を比較することで、sulfoglycosidaseであるBbhIIが腸の硫酸化O-結合型糖鎖、特に硫酸化core 2構造[Gal β 1-3(GlcNAc6S β 1-6)GalNAc α -O-Ser/Thr]の分解において重要な役割を果たすことも明らかとなった。一方で、本研究は*in vitro*の解析ではあるが、GH84が非硫酸化core 2構造およびcore 4構造の β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc結合の分解を担うことを明らかとすると共に、非還元末端側に伸長した糖鎖において β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc分岐鎖があった場合に、本酵素が作用することが他のGHが作用するために必要であることが示唆された。このことから、*in vivo*においてもBbhIIだけでなくBbhIVの酵素活性が*B. bifidum*による効率的なムチン糖鎖分解に重要である可能性が考えられた。

一方、BbhIVおよびBbhIIの*B. bifidum*における重要性は栄養源獲得という点で大きく異なる。以前の研究において、著者らが*B. bifidum*をPGMまたは卵白ムチン添加培地で培養し、24時間後の培養上清中の遊離単糖について調べた際、*B. bifidum*はFuc、Gal、およびNeu5Acを上清中に蓄積し、GlcNAcは完全に消費していることが分かった(Figure III-1Aおよび1C)(57)。つまり、*B. bifidum*はムチン構成単糖としては主にGlcNAcを資化することが明らかとなった。一方で、BbhIIの作用によって生じるGlcNAc6Sは、*B. bifidum*はsulfatase活性を有していないことから資化できない(43)。つまり、ムチン糖鎖の資化という点では、BbhIおよびBbhIVの活性が極めて重要である。

また、ムチン資化性菌として*A. muciniphila*をPGMまたは卵白ムチン添加培地で24時間培養後の上清中の遊離単糖について調べた際には、*A. muciniphila*はGlcNAcのみを培地中に蓄積し、Fuc、Gal、およびNeu5Acは消費されていた(Figure III-1C)。卵白ムチンで培養した際もGlcNAcが消費されずに上清中に残されていた(Figure III-1A)。このことから、*A. muciniphila*はGlcNAcよりも末端の修飾糖であるFucやNeu5Acを好んで資化することが推察された。*A. muciniphila*の持つGHに着目すると、ATCC BAA-835株は4つのGH33 (sialidase)、4つのGH29 (1,3/4- α -fucosidase)、2つのGH95 (1,2- α -fucosidase)、2つのGH109 (A型抗原特異的 α -N-acetylgalactosaminidase)、2つのGH110 (B型抗原特異的 α -galactosidase)、

および2つのGH89 (α -N-acetylglucosaminidase)は保有しているものの、Tn抗原(GalNAc- α -Ser/Thr)を分解するGH129やT抗原から生じるGNBを加リン酸分解するphosphorylaseは有さない(92)。このことから、*A. muciniphila*がムチンO-結合型糖鎖の非還元末端修飾糖部分を効率よく分解する酵素群を有していることが分かる。*A. muciniphila*のGH84は、*Bacteroides*属細菌のGH84と同じクレードに分類されたが(Figure II-21)、*Bacteroides thetaiotaomicron*の糖鎖の嗜好性を調べた結果では(93)、本菌はムチン糖鎖よりも食物繊維由来多糖などの糖鎖を優先的に資化することが明らかとされている。これらのことから、*B. thetaiotaomicron*はいわゆる「雑食」であり、ムチン資化に特化した菌ではないことが推察された。卵白ムチンを糖源とした培地で*A. muciniphila*を培養した後のO-結合型糖鎖解析では、core 2構造を基本骨格とする糖鎖が*B. bifidum*を培養した後よりも多く残されていた(Figure III-2)。卵白ムチンに結合したO-結合型糖鎖には、非硫酸化糖鎖が8種、硫酸化糖鎖が4種含まれ、いずれの糖鎖もcore 1またはcore 2構造を持つ。先述した通り、*A. muciniphila*のGH84は*B. bifidum*と別のクレードに分類されており、このことから*A. muciniphila*のGH84の機能は*B. bifidum*のGH84の機能とは異なることが推察された。

なお、*B. bifidum*はPGMと同様に卵白ムチンの糖鎖を良く分解し、培養後に残された卵白ムチン上の糖鎖量は*A. muciniphila*のそれと同等以下であったが、菌の増殖(CFUの上昇)は*A. muciniphila*のみで観察された(Figure III-3)。これは、PGMに占めるムチン糖鎖量が分子量全体の50%程度であるのに対し、卵白ムチンの場合は糖鎖量が少ないこと、また前述した通りムチン構成糖のうち*B. bifidum*はGlcNAcしか資化できないことが原因と考えられる。*A. muciniphila*はプロテアーゼを多く保有していることから、卵白ムチンのポリペプチド部分も栄養源として利用したためであろう。腸内細菌によるムチン利用能は、糖鎖やペプチドの分解活性だけでなく、分解後のそれぞれの糖やアミノ酸の資化能にも着目しつつ、それらの菌の生存戦略を理解する必要がある。

腸内細菌が様々な疾患に関与することや、健康維持において重要な役割を果たすことが明らかとなりつつあるが、「どのように腸内細菌叢が形成されるか」という根本的な問いへの全容解明はまだ発展途上である。秦の始皇帝が不老不死を求めた伝説が残っているように、長く健康に生きるということについて古くから人間はあこがれてきた。1900年にMechnikovによって不老長寿説が唱えられことは緒言に述べたが、奇しくもその前年に同じパスツール研究所に所属していたHenri Tissierによってビフィズス菌が単離されている。それから1世紀以上経つものの、腸内細菌による長寿への道のりはまだ遠い。*B. bifidum*を起点とした研究が、腸内細菌叢の形成機構を解明する上での一助となり、また、プロバイオティクスとしての科学的根拠を支えるものとなることを願っている。

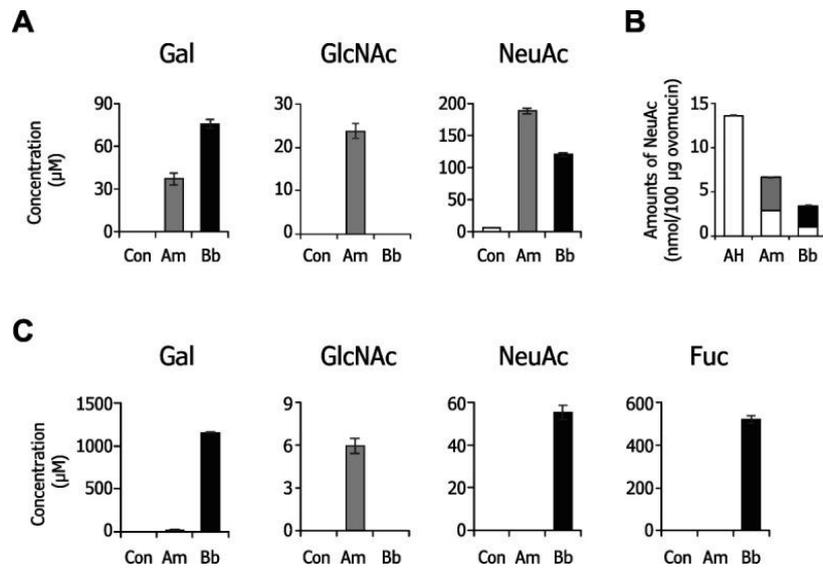


Figure III-1. 培養上清中の遊離単糖量

Akkermansia muciniphila (Am)または*Bifidobacterium bifidum* (Bb)を、0.5% 卵白ムチン(A)またはPGM (C)を含む培地で24時間培養した後の上清中の単糖をHPAEC-PADで解析した。Control (Con)は菌非接種の培地を24時間インキュベートしたものである。GalおよびGlcNAc、Neu5Ac、さらにPGMの際はFucの濃度を調べた。(B)培養前および*Akkermansia muciniphila*または*Bifidobacterium bifidum*培養後の卵白ムチン粉末中のNeu5Acを酸加水分解処理(AH)によって遊離し、定量した($n=3$ 、平均 \pm SE)。Takadaら(57)のFig. 5.を出版社の許可を得て転載。

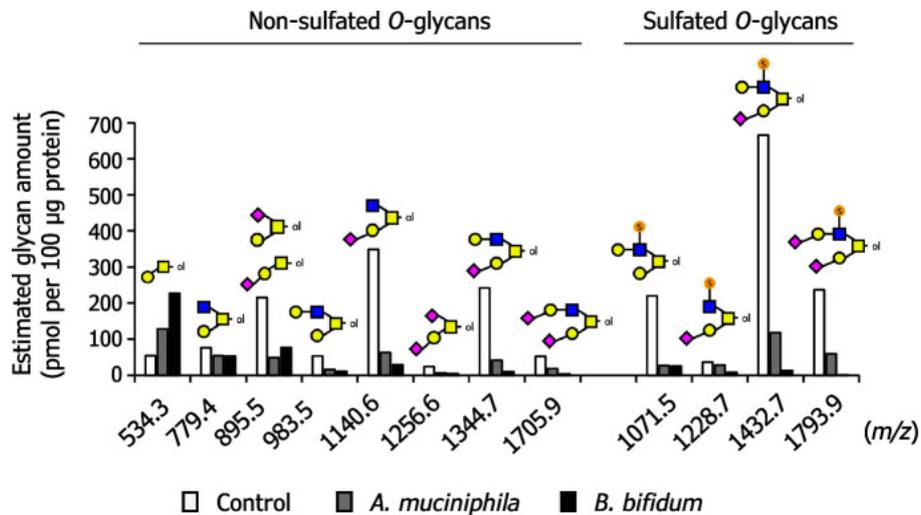


Figure III-2. ムチン資化性腸内細菌による卵白ムチンO-結合型糖鎖の分解

Akkermansia muciniphila JCM 30893および*Bifidobacterium bifidum* JCM 1254は、0.5%卵白ムチン粉末を炭素源として含む培地で培養した。コントロールは、24時間インキュベートした菌非接種培地を用いた。24時間培養後、ムチンO-結合型糖鎖をMALDI-TOF/MSにて解析した。非硫酸化糖鎖はLNFP I (500 pmol added)、硫酸化糖鎖はSulfo-Lewis^a (250 pmol added)のピークによって半定量を行った。Takadaら(57)のFig. 4.を出版社の許可を得て転載。

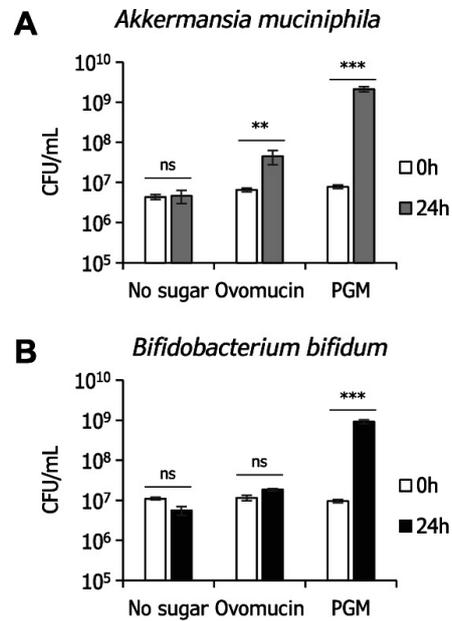


Figure III-3. 卵白ムチンおよびPGM添加培地におけるムチン資化性菌の生育
Akkermansia muciniphila JCM 30893 (A)および*Bifidobacterium bifidum* JCM 1254 (B)を0.5 %PGMまたは卵白ムチン粉末を含むbasal培地で培養した。0時間目および24時間目でCFUを測定した(平均 ± SE. $n = 3$, *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; ns, not significant, two-tailed t -test). Takadaら(57)のFig. 3. を出版社の許可を得て転載

引用文献

1. Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A., Surana, N. K., Edelman, S. M., Troy, E. B. Reading, N. C., Villablanca, E. J., Wang, S., Mora J. R., Umesaki, Y., Mathis D., Benoist, C., Relman, D. A., Kasper D. L. (2012) Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota *Cell* **149**, 1578-1593 10.1016/j.cell.2012.04.037
2. Song, X., Sun, X., Oh, S. F., Wu, M., Zhang, Y., Zheng, W., Geva-Zatorsky, N., Jupp, R., Matgis, D., Benoist C., Kasper D. L. (2020) Microbial bile acid metabolites modulate gut ROR γ . *Nature*. **577**, 410-415 10.1038/s41586-019-1865-0
3. Shimizu, H., Ohue-Kitano, R., Kimura, I. (2019) 腸内細菌由来短鎖脂肪酸における宿主エネルギー代謝機能制御. *Glycative Stress Research*. **6**, 181-191 10.24659/gsr.6.3_181
4. Bouter, K. E., van Raalte, D. H., Groen, A. K., Nieuwdorp, M. (2017) Role of the gut microbiome in the pathogenesis of obesity and obesity-related metabolic dysfunction. *Gastroenterology*. **152**, 1671-1678 10.1053/j.gastro.2016.12.048
5. Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biology*. **14**, e1002533 10.1371/journal.pbio.1002533
6. Laursen, M. F., Sakanaka, M., von Burg, N., Mörbe, U., Andersen, D., Moll, J. M., Pekmez C. T., Rivollier, A., Michaelsen, K F., Mølgaard, C., Lind, M, V., Dragsted, L, O., Katayama, T., Frandsen, H. L., Vinggaard, A. M., Bahl, M. I., Brix, S., Agace, W., Licht, T. R., Roager, H. M., (2021) *Bifidobacterium* species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut. *Nature Microbiology*. **6**, 1367-1382 10.1038/s41564-021-00970-4
7. Sasaki, Y., Komeno, M., Ishiwata, A., Horigome, A., Odamaki, T., Xiao, J.-Z., Tanaka, K., Ito, Y., Kitahara, K., Ashida, H., Fujita, K. (2022) Mechanism of cooperative degradation of gum arabic arabinogalactan protein by *Bifidobacterium longum* surface enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*. **88**, 6, 02187-21, 10.1128/aem.02187-21
8. Lang, T., Hansson, G. C., Samuelsson, T. (2007) Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**, 16209-16214 10.1073/pnas.0705984104
9. Perez-Vilar, J., Hill, R. L. (1999) The structure and assembly of secreted mucins. *Journal of Biological Chemistry*. **274**, 31751-31754 10.1074/jbc.274.45.31751
10. Javitt, G., Fass, D. (2022) Helical self-assembly of a mucin segment suggests an evolutionary origin for von Willebrand factor tubules. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. **119**, e2116790119 10.1073/pnas.2116790119
11. Johansson, M. E. V., Larsson, J. M. H., Hansson, G. C. (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

- 108**, 4659-4665 10.1073/pnas.1006451107
12. Guzman-Aranguez, A., Argüeso, P. (2010) Structure and biological roles of mucin-type *O*-glycans at the ocular surface. *Ocular Surface*. **8**, 8-17 10.1016/S1542-0124(12)70213-6
 13. Yao, Y., Kim, G., Shafer, S., Chen, Z., Kubo, S., Ji, Y., Luo, J., Yang, W., Perner, S. P., Kanellopoulou, C., Park, A, Y., Jiang, P., Li, J., Baris S., Aydiner, E, K., Ertem, D., Mulder, D, J., Warner, N., Griffiths, A, M., Topf-Olivestone, C., Kori, M., Werner, L., Ouahed, J., Field, M., Liu, C., Schwarz, B., Bosio, C, M., Ganesan, S., Song, J., Urlaub, H., Oellerich, T., Malaker, S, A., Zheng, L., Bertozzi, C, R., Zhang, Y., Matthews, H., Montgomery, W., Shih, H - Y., Jiang, J., Jones, M., Baras, A., Shuldiner, A., Gonzaga-Jauregui, C., Snapper, S, B., Muise, A, M., Shouval, D, S., Ozen, A., Pan, K - T., Wu, C., Lenardo, M, J. (2022) Mucus sialylation determines intestinal host-commensal homeostasis. *Cell*. **185**, 1172-1188.e1128 10.1016/j.cell.2022.02.013
 14. Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S. Kucherlapati, R., lipkin, M., Yang, K., Augenlicht, L. (2002) Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin *Muc2*. *Science*. **295**, 1726-1729 10.1126/science.1069094
 15. Hatayama, H., Iwashita, J., Kuwajima, A., and Abe, T. (2007) The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T *Biochemical and Biophysical Research Communications* **356**, 599-603 10.1016/j.bbrc.2007.03.025
 16. Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, Patrycja J., van der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G. Boehm, G., Goudoever, B, V., van Seuning, I., Renes, I, B. (2009) The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochemical Journal*. **420**, 211-219 10.1042/BJ20082222
 17. Arike, L., Holmén-Larsson, J., Hansson, G. C. (2017) Intestinal *Muc2* mucin *O*-glycosylation is affected by microbiota and regulated by differential expression of glycosyltransferases. *Glycobiology*. **27**, 318-328 10.1093/glycob/cww134
 18. Sheng, Y. H., Hasnain, S. Z. (2022) Mucus and Mucins: The underappreciated host defence system front cell infect. *Microbiology*. **12**, 856962 10.3389/fcimb.2022.856962
 19. Lindén, S. K., Sheng, Y. H., Every, A. L., Miles, K. M., Skoog, E. C., Florin, T. H. J. Sutton P., McGuckin M A. (2009) MUC1 limits *Helicobacter pylori* infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy. *PLoS pathogens*. **5**, 10.1371/journal.ppat.1000617
 20. Wheeler, K. M., Cárcamo-Oyarce, G., Turner, B. S., Dellos-Nolan, S., Co, J. Y., Lehoux, S. Cummings, R, D., Wozniak, D, J., Ribbeck, K. (2019) Mucin glycans attenuate the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in infection. *Nature microbiology*. **4**, 2146-2154 10.1038/s41564-019-0581-8
 21. Takagi, J., Aoki, K., Turner, B. S., Lamont, S., Lehoux, S., Kavanaugh, N. Gulati, M., Arevalo, A, V., Lawrence, T, J., Kim, C, Y., Bakshi, B., Ishihara, M., Nobile, C, J., Cummings, R, D., Wozniak,

- D, J., Tiemeyer, M., Hevey, R., Ribbeck, K. (2022) Mucin O-glycans are natural inhibitors of *Candida albicans* pathogenicity. *Nature chemical biology*. **18**, 762-773 10.1038/s41589-022-01035-1
22. Kudelka, M. R., Hinrichs, B. H., Darby, T., Moreno, C. S., Nishio, H., Cutler, C. E., Wang, J., Wu, H., Zeng, J., Wang, Y., Ju, T., Stowell, S. R., Nusrat, A., Jones, R. M., Neish, A. S., Cummings, R. D., (2016) Cosmc is an X-linked inflammatory bowel disease risk gene that spatially regulates gut microbiota and contributes to sex-specific risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **113**, 14787-14792 10.1073/pnas.1612158114
 23. Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., and de Vos, W. M. (2004) *Akkermansia muciphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 1469-1476 10.1099/ijs.0.02873-0
 24. Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., Martens, E. C. (2012) How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. **10**, 323-335 10.1038/nrmicro2746
 25. Martens, E. C., Chiang, H. C., Gordon, J. I. (2008) Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host and Microbe*. **4**, 447-457 10.1016/j.chom.2008.09.007
 26. Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M. Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G., Martens E.C. (2016) A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell*. **167**, 1339-1353.e1321 10.1016/j.cell.2016.10.043
 27. Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C. H., Westover, B. P., Weatherford, J. Buhler, J.D., Gordon, J. I. (2005) Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*. **307**, 1955-1959 10.1126/science.1109051
 28. Birchenough, G., Schroeder, B. O., Bäckhed, F., Hansson, G. C. (2019) Dietary destabilisation of the balance between the microbiota and the colonic mucus barrier. *Gut microbes*. **10**, 246-250 10.1080/19490976.2018.1513765
 29. Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G. C. (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**, 15064-15069 10.1073/PNAS.0803124105
 30. Asker, N., Axelsson, M. A. B., Olofsson, S. O., Hansson, G. C. (1998) Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a N-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus. *Journal of Biological Chemistry*. **273**, 18857-18863 10.1074/jbc.273.30.18857

31. Robbe, C., Capon, C., Coddeville, B., Michalski, J. C. (2004) Structural diversity and specific distribution of *O*-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochemical Journal*. **384**, 307-316 10.1042/BJ20040605
32. Milani, C., Mangifesta, M., Mancabelli, L., Lugli, G. A., James, K., Duranti, S. Turrone, F., Ferrario, C., Ossiprandi, M.C., Van Sinderen, D. Ventura, M. (2017) Unveiling bifidobacterial biogeography across the mammalian branch of the tree of life. *ISME Journal*. **11**, 2834-2847 10.1038/ismej.2017.138
33. Katoh, T., Ojima, M. N., Sakanaka, M., Ashida, H., Gotoh, A., Katayama, T. (2020) Enzymatic adaptation of *Bifidobacterium bifidum* to host glycans, viewed from glycoside hydrolyases and carbohydrate-binding modules. *Microorganisms*. **8**, 1-18 10.3390/microorganisms8040481
34. Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T., Makimura, Y., Hiratake, J., Sakata, K. Yamanoi, T., Kumagai, H., Yamamoto, K. (2004) Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). *Journal of Bacteriology*. **186**, 4885-4893 10.1128/JB.186.15.4885-4893.2004
35. Nagae, M., Tsuchiya, A., Katayama, T., Yamamoto, K., Wakatsuki, S., Kato, R. (2007) Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1,2- α -L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Journal of Biological Chemistry*. **282**, 18497-18509 10.1074/jbc.M702246200
36. Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H. Katayama, T., Yamamoto, K. (2009) Two distinct α -L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology*. **19**, 1010-1017 10.1093/glycob/cwp082
37. Sakurama, H., Fushinobu, S., Hidaka, M., Yoshida, E., Honda, Y., Ashida, H. Kitaoka M., Kumagai H., Yamamoto K., Katayama T. (2012) 1,3-1,4- α -L-Fucosynthase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. *Journal of Biological Chemistry*. **287**, 16709-16719 10.1074/jbc.M111.333781
38. Ashida, H., Tanigawa, K., Kiyohara, M., Katoh, T., Katayama, T., Yamamoto, K. (2018) Bifunctional properties and characterization of a novel sialidase with esterase activity from *Bifidobacterium bifidum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **82**, 2030-2039 10.1080/09168451.2018.1497944
39. Kiyohara, M., Tanigawa, K., Chaiwangsri, T., Katayama, T., Ashida, H., Yamamoto, K. (2011) An exo - Sialidase from bifidobacteria involved in the degradation of sialyloligosaccharides in human milk and intestinal glycoconjugates. *Glycobiology*. **21**, 437-447 10.1093/glycob/cwq175
40. Wada, J., Ando, T., Kiyohara, M., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamaguchi, M. Kumagai H., Katayama T., Yamamoto K. (2008) *Bifidobacterium bifidum* lacto-*N*-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Applied and Environmental*

- Microbiology*. **74**, 3996-4004 10.1128/AEM.00149-08
41. Ito, T., Katayama, T., Hattie, M., Sakurama, H., Wada, J., Suzuki, R. Ashida H., Wakagi T., Yamamoto K., Stubbs K.A., Fushinobu S. (2013) Crystal structures of a glycoside hydrolase family 20 lacto-*N*-biosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Journal of Biological Chemistry*. **288**, 11795-11806 10.1074/jbc.M112.420109
 42. Miwa, M., Horimoto, T., Kiyohara, M., Katayama, T., Kitaoka, M., Ashida, H. Yamamoto, K. (2010) Cooperation of β -galactosidase and β -*N*-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. *Glycobiology*. **20**, 1402-1409 10.1093/glycob/cwq101
 43. Katoh, T., Yamada, C., Wallace, M. D., Yoshida, A., Gotoh, A., Arai, M. Maeshibu, M., Kashima, T., Hagenbeek, A., Ojima, M. N., Takada, H., Sakanaka, M., Shimizu, H., Nishiyama, K., Ashida, H., Hirose, J., Suarez-Diez, M., Nishiyama, M., Kimura, I., Stubbs, K. A., Fushinobu, S., Katayama, T. (2023) A bacterial sulfoglycosidase highlights mucin *O*-glycan breakdown in the gut ecosystem. *Nature chemical biology*. 10.1038/s41589-023-01272-y
 44. Katoh, T., Maeshibu, T., Kikkawa, K. i., Gotoh, A., Tomabeche, Y., Nakamura, M. Liao, W.H., Yamaguchi, M., Ashida, H., Yamamoto, K., Katayama, T. (2017) Identification and characterization of a sulfoglycosidase from *Bifidobacterium bifidum* implicated in mucin glycan utilization. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **81**, 2018-2027 10.1080/09168451.2017.1361810
 45. Wakinaka, T., Kiyohara, M., Kurihara, S., Hirata, A., Chaiwangsri, T., Ohnuma, T. Fukamizo, T., Katayama, T., Ashida, H., Yamamoto, K. (2013) Bifidobacterial α -galactosidase with unique carbohydrate-binding module specifically acts on blood group B antigen. *Glycobiology*. **23**, 232-240 10.1093/glycob/cws142
 46. Shimada, Y., Watanabe, Y., Wakinaka, T., Funeno, Y., Kubota, M., Chaiwangsri, T. Kurihara, S., Yamamoto, K., Katayama, T., Ashida, H. (2015) α -*N*-Acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* specifically hydrolyzes α -linked *N*-acetylglucosamine at nonreducing terminus of *O*-glycan on gastric mucin. *Applied microbiology and biotechnology*. **99**, 3941-3948 10.1007/s00253-014-6201-x
 47. Neelamegham, S., Aoki-Kinoshita, K., Bolton, E., Frank, M., Lisacek, F., Lütteke, T. O'Boyle, N., Packer, N.H., Stanley, P., Toukach, P., Varki, A., Woods, R.J. (2019) Updates to the symbol nomenclature for glycans guidelines. *Glycobiology*. **29**, 620-624 10.1093/glycob/cwz045
 48. Turroni, F., Bottacini, F., Foroni, E., Mulder, I., Kim, J. H., Zomer, A. Sánchez, B., Bidossi, A., Ferrarini, A., Giubellini, V., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Fitzgerald, G.F., Mills, D., Margolles, A., Kelly D., Van Sinderen, D., Ventura, M. (2010) Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**, 19514-19519 10.1073/pnas.1011100107
49. Pluvinage, B., Massel, P. M., Burak, K., Boraston, A. B. (2020) Structural and functional analysis of four family 84 glycoside hydrolases from the opportunistic pathogen *Clostridium perfringens*. *Glycobiology*. **30**, 58-68 10.1093/GLYCOB/CWZ069
 50. Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., Mills, D. A. (2012) Release and utilization of *N*-acetyl-D-glucosamine from human milk oligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. *Anaerobe*. **18**, 430-435 10.1016/j.anaerobe.2012.04.012
 51. Macauley, M. S., Whitworth, G. E., Debowski, A. W., Chin, D., and Vocadlo, D. J. (2005) *O*-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: Kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors *Journal of Biological Chemistry* **280**, 25313-25322 10.1074/jbc.M413819200
 52. Zachara, N. E., Hart, G. W. (2004) *O*-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1673**, 13-28 10.1016/j.bbagen.2004.03.016
 53. Harata, G., He, F., Takahashi, K., Hosono, A., Kawase, M., Kubota, A. Hiramatsu, M., Kaminogawa, S. (2010) *Bifidobacterium* suppresses IgE-mediated degranulation of rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Microbiology and Immunology*. **54**, 54-57 10.1111/j.1348-0421.2009.00185.x
 54. Gotoh, A., Katoh, T., Sugiyama, Y., Kurihara, S., Honda, Y., Sakurama, H. Kambe, T., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K., Katayama, T. (2015) Novel substrate specificities of two lacto-*N*-biosidases towards β -linked galacto-*N*-biase-containing oligosaccharides of globo H, Gb5, and GA1. *Carbohydrate Research*. **408**, 18-24 10.1016/j.carres.2015.03.005
 55. Turroni, F., Feroni, E., Montanini, B., Viappiani, A., Strati, F., Duranti, S. Ferrarini, A., Delle Donne, M., Sinderen, D., Van Ventura M. (2011) Global genome transcription profiling of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 under in vitro conditions and identification of reference genes for quantitative real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*. **77**, 8578-8587 10.1128/AEM.06352-11
 56. Anderson, K., Li, S. C., Li, Y. T. (2000) Diphenylamine-aniline-phosphoric acid reagent, a versatile spray reagent for revealing glycoconjugates on thin-layer chromatography plates. *Analytical Biochemistry*. **287**, 337-339 10.1006/abio.2000.4829
 57. Takada, H., Katoh, T., Katayama, T. (2020) Sialylated *O*-glycans from hen egg white ovomucin are decomposed by mucin-degrading gut microbes. *Journal of Applied Glycoscience*. **67**, 31-39 10.5458/jag.jag-2019_0020
 58. Kumagai, T., Katoh, T., Nix, D. B., Tiemeyer, M., Aoki, K. (2013) In-gel β -elimination and aqueous - organic partition for improved *O*- and sulfoglycomics. *Analytical Chemistry*. **85**, 8692-

8699 10.1021/ac4015935

59. Takada, H., Katoh, T., Sakanaka, M., Odamaki, T., Katayama, T. (2023) GH20 and GH84 β -N-acetylglucosaminidases with different linkage specificities underpin mucin O-glycan breakdown capability of *Bifidobacterium bifidum*. *Journal of Biological Chemistry*. 104781 10.1016/j.jbc.2023.104781
60. Sakanaka, M., Hansen, M. E., Gotoh, A., Katoh, T., Yoshida, K., Odamaki, T. Yachi H., Sugiyama, Y., Kurihara S., Hirose, J., Urashima, T., Xiao, Jin-Zhong., Kitaoka, M., Fukiya S., Yokota, A., Leggio, L. L., Hachem, M.A., Katayama, T. (2019) Evolutionary adaptation in fucosyllactose uptake systems supports bifidobacteria-infant symbiosis. *Science Advances*. **5**, 1-16 10.1126/sciadv.aaw7696
61. Park, M. J., Park, M. S., Ji, G. E. (2019) Improvement of electroporation-mediated transformation efficiency for a *Bifidobacterium* strain to a reproducibly high level. *Journal of Microbiological Methods*. **159**, 112-119 10.1016/j.mimet.2018.11.019
62. Serafini, F., Turrone, F., Guglielmetti, S., Gioiosa, L., Foroni, E., Sanghez, V. Bartolomucci, A., Motherway, M. O., Palanza, P., van Sinderen, Doue., Ventura, M. (2012) An efficient and reproducible method for transformation of genetically recalcitrant bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. **333**, 146-152 10.1111/j.1574-6968.2012.02605.xx
63. Yasui, K., Kano, Y., Tanaka, K., Watanabe, K., Shimizu-Kadota, M., Yoshikawa, H., Suzuki, T. (2009) Improvement of bacterial transformation efficiency using plasmid artificial modification. *Nucleic Acids Research*. **37**, 2-8 10.1093/nar/gkn884
64. Yoshida, E., Sakurama, H., Kiyohara, M., Nakajima, M., Kitaoka, M., Ashida, H. Hirose, J., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H. (2012) *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* uses two different-galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. *Glycobiology*. **22**, 361-368 10.1093/glycob/cwr116
65. Drula, E., Garron, M.-L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., Terrapon, N. (2022) The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic acids research*. **50**, D571-D577 10.1093/nar/gkab1045
66. Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H. R. Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L.L., Bateman, A. (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*. **36**, 281-288 10.1093/nar/gkm960
67. Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N. Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D., Lopez, R. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*. **47**, W636-W641 10.1093/nar/gkz268
68. Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*. **14**, 378-379

- 10.1093/bioinformatics/14.4.378
69. Ojima, M. N., Jiang, L., Arzamasov, A. A., Yoshida, K., Odamaki, T., Xiao, J., Nakajima, A., Kitaoka, M., Hirose, J., Urashima, T., Katoh, T., Gotoh, A., van Sinderen, D., Rodionov, D.A., Osterman, A.L., Sakanaka, M., Katayama, T. (2022) Priority effects shape the structure of infant-type *Bifidobacterium* communities on human milk oligosaccharides. *ISME journal*. 10.1038/s41396-022-01270-3
 70. Williams, R. J., Henderson, B., Sharp, L. J., Nair, S. P. (2002) Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*. **70**, 6805-6810 10.1128/IAI.70.12.6805-6810.2002
 71. Greig, I. R., Zahariev, F., Withers, S. G. (2008) Elucidating the nature of the *Streptomyces plicatus* beta-hexosaminidase-bound intermediate using ab initio molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*. **130**, 17620-17628 10.1021/ja805640c
 72. Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., Sonnhammer, E. L. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes *Journal of Molecular Biology*. **305**, 567-580 10.1006/jmbi.2000.4315
 73. Cheng, P.-F., Snovida, S., Ho, M.-Y., Cheng, C.-W., Wu, A. M., Khoo, K.-H. (2013) Increasing the depth of mass spectrometry-based glycomic coverage by additional dimensions of sulfoglycomics and target analysis of permethylated glycans. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **405**, 6683-6695 10.1007/s00216-013-7128-2
 74. Benjamini, Y., Hochberg, Y., Benjamini, Y. H. Y. (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. **57**, 289-300
 75. Gotoh, A., Katoh, T., Sakanaka, M., Ling, Y., Yamada, C., Asakuma, S., Urashima, T., Tomabechi, Y., Katayama-Ikegami, A., Kurihara, S., Yamamoto, K., Harata, G., He, F., Hirose, J., Kitaoka, M., Okuda, S., Katayama, T. (2018) Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. *Scientific Reports*. **8**, 10.1038/s41598-018-32080-3
 76. Chiku, K., Nishimoto, M., and Kitaoka, M. (2010) Thermal decomposition of beta-D-galactopyranosyl-(1-->3)-2-acetamido-2-deoxy-D-hexopyranoses under neutral conditions. *Carbohydrate research*. **345**, 1901-1908 10.1016/j.carres.2010.06.003
 77. Klein, N. C., Cunha, B. A. (1995) Tetracyclines. *Medical Clinics of North America*. **79**, 789-801 10.1016/s0025-7125(16)30039-6
 78. Nishiyama, K., Nagai, A., Urabayashi, K., Yamamoto, Y., Mukai, T., Okada, N. (2018) Two extracellular sialidases from *Bifidobacterium bifidum* promote the degradation of sialyl-oligosaccharides and support the growth of *Bifidobacterium breve*. *Anaerobe*. **52**, 22-28

- 10.1016/j.anaerobe.2018.05.007
79. Parche, S., Beleut, M., Rezzonico, E., Jacobs, D., Arigoni, F., Titgemeyer, F. Jankovic, I. (2006) Lactose-over-glucose preference in *Bifidobacterium longum* NCC2705: glcP, encoding a glucose transporter, is subject to lactose repression. *Journal of bacteriology*. **188**, 1260-1265 10.1128/JB.188.4.1260-1265.2006
 80. Sheldon, W. L., Macauley, M. S., Taylor, E. J., Robinson, C. E., Charnock, S. J., Davies, G. J., Vocadlo, D.J., Black, G.W. (2006) Functional analysis of a group A streptococcal glycoside hydrolase Spy1600 from family 84 reveals it is a β -*N*-acetylglucosaminidase and not a hyaluronidase. *Biochemical Journal*. **399**, 241-247 10.1042/BJ20060307
 81. Ostrowski, A., Gundogdu, M., Ferenbach, A. T., Lebedev, A. A., van Aalten, D. M. (2015) Evidence for a Functional *O*-Linked *N*-Acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) System in the Thermophilic Bacterium *Thermobaculum terrenum*. *Journal of Biological Chemistry*. **290**, 30291-30305 10.1074/jbc.M115.689596
 82. Raimondi, S., Musmeci, E., Candeliere, F., Amaretti, A., Rossi, M. (2021) Identification of mucin degraders of the human gut microbiota. *Scientific Reports*. **11**, 11094-11094 10.1038/s41598-021-90553-4
 83. Lindstad, L. J., Lo, G., Leivers, S., Lu, Z., Michalak, L., Pereira, G. V. Røhr, A.K., Martens, E. C., McKee, L. S., Louis, P., Duncan, S. H., Westereng, B., Pope, P. B., Rosa, S. L. L. (2021) Human gut *Faecalibacterium prausnitzii* deploys a highly efficient conserved system to cross-feed on β -mannan-derived oligosaccharides. *mBio*. **12**, e0362820 10.1128/mBio.03628-20
 84. Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai H., Ashida H., Hirose J., Kitaoka M. (2011) Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *Journal of Biological Chemistry*. **286**, 34583-34592 10.1074/jbc.M111.248138
 85. Arzamasov, A. A., Nakajima, A., Sakanaka, M., Ojima, M. N., Katayama, T., Rodionov, D. A., Osterman A.L. (2022) Human milk oligosaccharide utilization in intestinal bifidobacteria is governed by global transcriptional regulator NagR. *mSystems*. **7**, e0034322 10.1128/msystems.00343-22
 86. Dennis, R. J., Taylor, E. J., Macauley, M. S., Stubbs, K. A., Turkenburg, J. P., Hart, S. J. Black, G.N., Vocadlo, D.J., Davies, G.J. (2006) Structure and mechanism of a bacterial beta-glucosaminidase having *O*-GlcNAcase activity. *Nature Structural & Molecular Biology*. **13**, 365-371 10.1038/nsmb1079
 87. He, X., Gao, J., Peng, L., Hu, T., Wan, Y., Zhou, M. Zhen, P., Cao, H. (2021) Bacterial *O*-GlcNAcase genes abundance decreases in ulcerative colitis patients and its administration ameliorates colitis in mice. *Gut*. **70**, 1872-1883 10.1136/gutjnl-2020-322468

88. Heckel, D., Comtesse, N., Brass, N., Blin, N., Zang, K. D., Meese, E. (1998) Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Human Molecular Genetics*. **7**, 1859-1872 10.1093/hmg/7.12.1859
89. Asker, N., Axelsson, M. A., Olofsson, S. O., Hansson, G. C. (1998) Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a *N*-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus. *Journal of Biological Chemistry*. **273**, 18857-18863 10.1074/jbc.273.30.18857
90. Kondo, N., Nikoh, N., Ijichi, N., Shimada, M., Fukatsu, T. (2002) Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**, 14280-14285 10.1073/pnas.222228199
91. Kim, M. J., Ku, S., Kim, S. Y., Lee, H. H., Jin, H., Kang, S. Li, R., Johnston, T.V., Park, M.S., Ji, G.E. (2018) Safety evaluations of *Bifidobacterium bifidum* BGN4 and *Bifidobacterium longum* BORI. *International Journal of Molecular Sciences*. **19**, 1422 10.3390/ijms19051422
92. Bae, M., Cassilly, C. D., Liu, X., Park, S.-M., Tusi, B. K., Chen, X. Kwon, J., Filipčík, P., Bolze, A. S., Liu, Z., Vlamakis, H., Graham, D. B., Buhrlage, S. J., Xavier, R. J., Clardy, J. (2022) *Akkermansia muciniphila* phospholipid induces homeostatic immune responses. *Nature*. **608**, 168-173 10.1038/s41586-022-04985-7
93. Pudlo, N. A., Urs, K., Kumar, S. S., German, J. B., Mills, D. A., Martens, E. C. (2015) Symbiotic human gut bacteria with variable metabolic priorities for host mucosal glycans. *mBio*. **6**, e01282-01215 10.1128/mBio.01282-15

補足資料

Supplementary Table S1. 第二章で使用したプライマーおよび鋳型

Target	Template	Primer name	Sequence (5'-3')
For protein expression			
pET3a	pET3a	pET3a_inversePCR_F	aagaagcaccatcaccat
		pET3a_inversePCR_R	gccatagtatatctcttc
BbhIV	<i>B. bifidum</i> JCM 1254 WT	BbhIV_pET3a_F	AGATATACATATGGCaggcggcgatacggcgcgca
		BbhIV_pET3a_R	GTGATGGTGCTTCTTctgcacgtcggcgccggtct
pET23b	pET23b	pET23b-inversePCR-F	ctcgagcaccaccacc
		pET23b-inversePCR-R	catatgtatatctcctt
BbhV	<i>B. bifidum</i> JCM 1254 WT	BbhV_pETE23b_F	GGAGATATACATATGgccagcgacagcgccagcgcc
		BbhV_pETE23b_R	TGGTGGTGCTCGAGgcccggtgttgacagcttgc
For targeted gene disruption (amplification of the homologous region)			
<i>bbhI</i> (for insertion into pMSK151)	<i>B. bifidum</i> JCM 1254 WT	dBbhI_pMSK151_F	CCTGCAGAGTACTGgggcaccgcgcagaacaagg
		dBbhI_pMSK151_R	TTTGCTCAGAATTCGatccgccttcagccagatg
<i>bbhI</i> (for insertion into pMS207)	<i>B. bifidum</i> JCM 1254 WT	dBbhI_pMS207_F	ACGTTTCATGAATTaggcaccgcgcagaacaagg
		dBbhI_pMS207_R	GCCTAAGCGCCATTaattccgccttcagccagatg
<i>bbhIV</i>	<i>B. bifidum</i> JCM 1254 WT	dBbhIV_pMSK151_F	CCTGCAGAGTACTGtacattcttcgcacatcaa
		dBbhIV_pMSK151_R	TTTGCTCAGAATTCGccttggggcgtagaagtac
<i>bbhV</i>	<i>B. bifidum</i> JCM 1254 WT	dBbhV_pMSK151_F	CCTGCAGAGTACTGggcgccagcgacagcgcgca
		dBbhV_pMSK151_R	TTTGCTCAGAATTCgtctgacggcgcgcccgccgc
For genomic PCR and direct sequencing			
<i>bbhI</i>	<i>B. bifidum</i> JCM 1254 WT or mutant strain	dBbhI_check_F	gagagtgaagcgccatag
		dBbhI_check_R	ggtgtaggacaggtcgaagc
<i>bbhIV</i>	<i>B. bifidum</i> JCM 1254 WT or mutant strain	dBbhIV_check_F	gtaaggcattaggagccctg
		dBbhIV_check_R	gtcgagagcgaacgaaac
<i>bbhV</i>	<i>B. bifidum</i> JCM 1254 WT or mutant strain	dBbhV_check_F	cagatataccgcagcgacgagg
		dBbhV_check_R	cgttggacgggatgtctctgtac
For RT-qPCR			
<i>uvrD</i> (amplicon size: 114 bp)	<i>B. bifidum</i> JCM 1254 cDNA	UvrD-qF	cagtctccactccattgat
		UvrD-qR	ctcgatccccgtattgetta
<i>bbhI</i> (amplicon size: 139 bp)	<i>B. bifidum</i> JCM 1254 cDNA	bbhI-qF	tcaacgagatcgtccctac
		bbhI-qR	cagtcttgaccacagtt

<i>bbhII</i> (amplicon size: 141 bp)		bbhII-qF	ctgaaggatgacggttcgat
		bbhII-qR	cttgatctggggcttgtgt
<i>bbhIV</i> (amplicon size: 116 bp)		bbhIV-qF	aaggttaacggcagcgagta
		bbhIV-qR	tcgatgtctgctggttgag
<i>bbhV</i> (amplicon size: 162 bp)		bbhV-qF	aaccgtggatcagctactgg
		bbhV-qR	agtaatcggcgatcgtatgc
Uppercase letters represent 15-bp extension sequences required for In-Fusion cloning.			

Supplementary Table S2. 精製酵素処理したPGMの非硫酸化糖鎖アルジトール体

Glycosyl composition*	GlyYouCan ID	m/z [M+Na] ⁺		No enzyme control	BbhI-treated PGM		BbhIV-treated PGM		BbhV-treated PGM	
				Semi-quantified amount (pmol per 0.1 mg protein)	Semi-quantified amount (pmol per 0.1 mg protein)	<i>q</i> -value	Semi-quantified amount (pmol per 0.1 mg protein)	<i>q</i> -value	Semi-quantified amount (pmol per 0.1 mg protein)	<i>q</i> -value
		Theoretical	Observed**	Mean ± SD	Mean ± SD	(vs control)	Mean ± SD	(vs control)	Mean ± SD	(vs control)
H1-HexNAcitol	G29931IJ	534.37	534.27	3743.94 ± 583.64	4619.93 ± 1061.33	0.611	4350.52 ± 732.18	0.669	3051.02 ± 694.29	0.611
F1H1-HexNAcitol	G76163CP	708.42	708.36	6905.84 ± 792.58	7989.98 ± 610.38	0.391	9364.20 ± 1799.58	0.346	6740.21 ± 645.52	0.829
H1N1-HexNAcitol	G32550BI	779.45	779.38	14172.79 ± 1359.38	19291.85 ± 2348.02	0.261	21591.60 ± 4047.75	0.282	14819.84 ± 1852.89	0.750
N2-HexNAcitol	G41116RW	820.44	820.33	127.66 ± 102.09	160.15 ± 32.49	0.750	157.99 ± 8.57	0.750	77.89 ± 29.20	0.689
NA1H1-HexNAcitol	G60554YG	895.48	895.43	12.04 ± 2.78	18.00 ± 11.05	0.672	17.82 ± 7.34	0.611	22.55 ± 20.98	0.672
F1H1N1-HexNAcitol	G22355FZ	953.51	953.47	5040.05 ± 518.26	5906.40 ± 524.27	0.363	4077.54 ± 467.18	0.326	4855.49 ± 481.86	0.754
H2N1-HexNAcitol	G63628AV	983.52	983.46	1789.31 ± 304.20	1994.43 ± 170.07	0.669	2021.84 ± 91.71	0.611	1599.56 ± 295.75	0.692
H1N2-HexNAcitol	G60554YG	1024.58	1024.51	3873.06 ± 356.99	5295.28 ± 671.65	0.261	2492.78 ± 284.50	0.121	4447.99 ± 910.55	0.669
NA1F1H1-HexNAcitol	G05917SW	1069.58	1069.50	15.39 ± 7.39	24.84 ± 13.35	0.669	25.24 ± 5.47	0.391	27.82 ± 23.08	0.672
NA2H1N1-HexNAcitol	G60382VE	1140.59	1140.54	14.89 ± 3.27	17.90 ± 8.61	0.750	20.32 ± 0.99	0.308	29.57 ± 26.38	0.672
F1H2N1-HexNAcitol	G31685JQ	1157.60	1157.56	2465.88 ± 231.07	2794.23 ± 111.73	0.346	3159.90 ± 288.42	0.261	2459.16 ± 229.37	0.978
F1H1N2-HexNAcitol	G82385HC	1198.63	1198.58	930.47 ± 102.91	981.50 ± 38.04	0.689	969.98 ± 41.44	0.750	886.09 ± 118.22	0.750
H2N2-HexNAcitol	G38100FJ	1228.68	1228.57	2777.68 ± 256.57	3581.89 ± 292.20	0.261	4015.25 ± 612.39	0.261	2859.33 ± 238.83	0.777
F2H2N1-HexNAcitol	G26993IO	1331.68	1331.61	3278.15 ± 220.52	3604.50 ± 615.93	0.672	3107.89 ± 249.99	0.672	2995.70 ± 530.33	0.672
NA1H2N2-HexNAcitol	G75299FS	1344.67	1345.63	28.17 ± 14.24	43.05 ± 24.50	0.672	47.90 ± 2.49	0.326	34.39 ± 16.61	0.750
F1H2N2-HexNAcitol	G92628GI	1402.72	1402.66	5612.79 ± 512.78	7590.17 ± 924.20	0.261	7495.03 ± 1544.06	0.366	5864.18 ± 554.58	0.750
H3N2-HexNAcitol	G60145BJ	1432.74	1432.66	679.65 ± 304.43	1004.10 ± 312.89	0.611	782.56 ± 39.99	0.750	558.78 ± 251.70	0.750
H2N3-HexNAcitol	G64140ZZ	1473.77	1473.66	3989.20 ± 470.46	5816.50 ± 1129.64	0.308	5345.89 ± 1375.79	0.470	4194.18 ± 291.04	0.746
NA1F1H2N1-HexNAcitol	G46056UB	1518.80	1518.73	14.87 ± 6.83	17.38 ± 4.55	0.750	25.73 ± 8.13	0.411	20.62 ± 12.26	0.712
F2H3N1-HexNAcitol	G64162JC	1535.79	1535.74	50.26 ± 20.95	66.42 ± 4.54	0.611	46.54 ± 7.02	0.829	47.71 ± 17.30	0.903
F2H2N2-HexNAcitol	G67999CW	1576.82	1576.70	377.54 ± 16.45	390.82 ± 48.15	0.754	350.03 ± 8.49	0.308	339.14 ± 50.08	0.611
F1H3N2-HexNAcitol	G94854LT	1606.83	1606.69	172.96 ± 34.98	187.32 ± 35.04	0.750	226.71 ± 9.56	0.308	140.12 ± 43.73	0.669

F1H2N3-HexNAcitol	G16143FT	1647.86	1647.74	2003.07 ± 184.04	2658.68 ± 441.57	0.326	2247.08 ± 394.46	0.672	2038.33 ± 158.69	0.844
H3N3-HexNAcitol	G78977TF	1677.91	1677.75	350.41 ± 108.49	504.54 ± 115.10	0.442	418.75 ± 44.42	0.669	319.78 ± 90.04	0.777
H2N4-HexNAcitol	G24646ZK	1718.89	1718.75	81.88 ± 6.43	76.48 ± 7.67	0.672	37.17 ± 6.82	0.044	86.04 ± 6.83	0.692
F2H3N2-HexNAcitol	G07869EJ	1780.92	1780.77	161.75 ± 26.18	169.76 ± 24.11	0.777	281.09 ± 16.77	0.076	138.32 ± 26.76	0.669
F2H2N3-HexNAcitol	G54543GL	1821.95	1821.78	246.30 ± 23.38	264.44 ± 48.37	0.750	235.76 ± 32.49	0.754	212.05 ± 36.40	0.611
F1H3N3-HexNAcitol	G49874UX	1851.93	1851.81	252.81 ± 29.83	337.93 ± 46.15	0.308	296.54 ± 19.41	0.346	232.34 ± 41.32	0.712
H4N3-HexNAcitol	G81295CK	1881.97	1881.85	18.63 ± 5.96	35.80 ± 14.66	0.391	29.25 ± 5.82	0.346	25.19 ± 15.00	0.712
F1H2N4-HexNAcitol	G68572BA	1892.98	1892.84	34.08 ± 4.47	49.03 ± 2.70	0.126	25.63 ± 6.69	0.398	36.52 ± 3.83	0.712
H3N4-HexNAcitol	G31936TA	1922.99	1922.79	125.26 ± 9.66	153.16 ± 22.67	0.374	196.27 ± 52.95	0.343	119.37 ± 18.07	0.750
F2H3N3-HexNAcitol	G51287LK	2026.05	2025.86	200.96 ± 7.26	225.49 ± 34.55	0.623	53.76 ± 4.20	0.001	180.24 ± 33.88	0.669
F1H4H3-HexNAcitol	G46687AB	2056.06	2055.94	21.77 ± 5.49	34.38 ± 4.46	0.278	25.77 ± 1.26	0.614	24.21 ± 9.14	0.777
F1H3N4-HexNAcitol	G10256JP	2097.08	2096.89	124.30 ± 16.77	151.47 ± 14.81	0.346	75.68 ± 23.20	0.284	124.71 ± 16.54	0.978
H3N5-HexNAcitol	G14260UH	2168.12	2167.90	58.86 ± 11.19	53.75 ± 21.08	0.777	18.62 ± 4.07	0.097	63.98 ± 2.67	0.692
F1H3N4-HexNAcitol	G10256JP	2271.17	2270.97	16.16 ± 3.55	28.45 ± 5.30	0.261	30.48 ± 9.77	0.326	20.13 ± 6.24	0.672
F3H4N3-HexNAcitol	G47448YK	2404.23	2404.02	36.37 ± 6.25	49.49 ± 4.93	0.292	27.55 ± 3.37	0.346	30.75 ± 8.49	0.672
F2H4N4-HexNAcitol	G70418MS	2475.27	2474.99	19.65 ± 0.67	29.90 ± 1.31	0.015	19.80 ± 7.52	0.978	17.42 ± 3.65	0.669
Total				59824.9 ± 6672.4	76219.4 ± 9802.1		73712.5 ± 12266.3		59740.7 ± 7812.1	

*Abbreviation. NA: *N*-acetylneuraminic acid; F: fucose; H: hexose; N: *N*-acetylhexosamine; HexNAcitol: *N*-acetylhexosamine alditol.

**The ion peaks whose mean values were estimated to be larger than 10 pmol/100 ug PGM at least in one sample and whose glycosyl compositions were confirmed by MS/MS analysis are shown. The ion peaks at *m/z* 575, 738, 749, 912, 1188, 1362, 1637, 1765, 1985, 2506, 2679, and 2791 were unassigned as glycans.

Supplementary Table II-S3. 各*B. bifidum*欠損株培養後のPGMから遊離した非硫酸化O-結合型糖鎖アルジトール体

Glycosyl composition*	GlyYouCan ID	m/z [M + Na] ⁺		Non-inoculated	WT	BbhI ⁻		BbhIV ⁻		BbhV ⁻		BbhI ⁻ BbhIV ⁻	
		Theoretical	Observed**	Semi-quantified amount (pmol per 0.1 mg protein)	Semi-quantified amount (pmol per 0.1 mg protein)	Semi-quantified amount (pmol per 0.1 mg protein)	<i>q</i> -value	Semi-quantified amount (pmol per 0.1 mg protein)	<i>q</i> -value	Semi-quantified amount (pmol per 0.1 mg protein)	<i>q</i> -value	Semi-quantified amount (pmol per 0.1 mg protein)	<i>q</i> -value
				Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	(vs WT)						
H1-GalNAc-itol	G29931IJ	534.37	534.28	5104.2 ± 2263.3	1761.0 ± 237.4	2500.4 ± 110.8	0.048	3470.8 ± 354.3	0.027	1664.5 ± 330.9	0.772	2542.2 ± 785.4	0.288
F1H1-GalNAcitol	G76163CP	708.42	708.37	5985.1 ± 3137.0	1199.2 ± 169.1	1113.7 ± 147.4	0.640	1124.1 ± 95.1	0.636	871.6 ± 196.9	0.199	1163.1 ± 308.2	0.906
H1N1-HexNAcitol	G32550BI	779.45	779.41	8156.5 ± 5937.8	1205.1 ± 148.0	3011.3 ± 253.2	0.012	4249.3 ± 374.5	0.009	886.8 ± 226.1	0.214	4240.9 ± 1700.6	0.105
N2-HexNAcitol	G41116RW	820.44	820.44	15.5 ± 2.0	12.9 ± 2.2	22.7 ± 4.6	0.090	32.2 ± 9.3	0.085	11.1 ± 2.1	0.473	18.5 ± 3.0	0.143
NA1H1-HexNAcitol	G60554YG	895.48	895.48	118.6 ± 124.4	13.6 ± 4.8	9.2 ± 0.3	0.310	27.0 ± 16.3	0.355	7.7 ± 1.3	0.214	33.2 ± 9.3	0.094
F1H1N1-HexNAcitol	G22355FZ	953.51	953.52	4125.9 ± 1621.7	2027.2 ± 238.8	2406.0 ± 103.2	0.149	2745.0 ± 16.3	0.041	2035.9 ± 437.8	0.977	3095.0 ± 635.9	0.134
H2N1-HexNAcitol	G63628AV	983.52	983.54	1563.0 ± 106.5	583.6 ± 81.7	599.6 ± 49.8	0.840	493.1 ± 25.0	0.250	479.4 ± 146.7	0.458	481.6 ± 20.7	0.210
H1N2-HexNAcitol	G60554YG	1024.58	1024.54	3232.1 ± 868.0	984.5 ± 98.1	1669.6 ± 568.0	0.214	2383.1 ± 510.8	0.052	1002.8 ± 183.4	0.920	1565.1 ± 320.6	0.110
NA1F1H1-HexNAcitol	G05917SW	1069.58	1069.54	18.6 ± 19.3	5.4 ± 1.6	5.8 ± 1.1	0.772	8.1 ± 2.1	0.259	6.4 ± 2.0	0.621	8.1 ± 1.3	0.194
NA2H1N1-HexNAcitol	G60382VE	1140.59	1140.62	94.7 ± 91.9	26.8 ± 6.2	20.8 ± 2.0	0.307	27.7 ± 2.4	0.863	21.9 ± 5.9	0.495	21.5 ± 4.0	0.397
F1H2N1-HexNAcitol	G31685JQ	1157.6	1157.62	1714.1 ± 514.2	144.9 ± 12.5	141.5 ± 45.9	0.924	140.4 ± 21.3	0.830	139.3 ± 28.9	0.830	217.2 ± 46.0	0.138
F1H1N2-HexNAcitol	G82385HC	1198.63	1198.65	319.5 ± 41.3	181.9 ± 17.8	488.8 ± 238.8	0.194	565.9 ± 125.8	0.041	176.9 ± 34.7	0.876	377.0 ± 90.7	0.081
H2N2-HexNAcitol	G38100FJ	1228.68	1228.67	1867.7 ± 365.0	82.5 ± 6.5	216.7 ± 107.7	0.203	470.6 ± 99.5	0.028	78.2 ± 20.3	0.816	320.5 ± 89.5	0.053
F2H2N1-HexNAcitol	G26993IO	1331.68	1331.71	1276.2 ± 329.1	8.2 ± 0.5	16.9 ± 9.0	0.287	11.1 ± 2.5	0.214	7.8 ± 2.0	0.821	16.4 ± 3.7	0.078
NA1H2N2-HexNAcitol	G75299FS	1344.67	1345.68	16.5 ± 9.7	22.9 ± 3.6	23.7 ± 10.3	0.924	22.4 ± 1.6	0.876	4.6 ± 2.4	0.026	31.8 ± 12.8	0.425
F1H2N2-HexNAcitol	G92628GI	1402.72	1402.73	2515.7 ± 643.6	1296.5 ± 49.2	1340.5 ± 616.9	0.924	1567.4 ± 259.7	0.259	1417.4 ± 274.5	0.610	2668.7 ± 284.3	0.020
H3N2-HexNAcitol	G60145BJ	1432.74	1432.75	138.1 ± 29.9	74.3 ± 11.5	89.0 ± 50.3	0.733	81.9 ± 13.8	0.615	89.9 ± 34.4	0.610	89.3 ± 28.8	0.564
H2N3-HexNAcitol	G64140ZZ	1473.77	1473.79	2741.7 ± 776.5	13.0 ± 1.8	52.4 ± 31.9	0.205	223.0 ± 95.4	0.078	14.5 ± 5.1	0.733	90.8 ± 30.8	0.057
NA1F1H2N1-HexNAcitol	G46056UB	1518.8	1518.77	12.6 ± 12.9	1.7 ± 0.6	3.0 ± 1.1	0.240	4.0 ± 0.3	0.032	1.2 ± 0.5	0.437	4.8 ± 0.8	0.041
F2H3N1-HexNAcitol	G64162JC	1535.79	1535.76	57.3 ± 8.4	2.0 ± 0.3	2.5 ± 0.6	0.381	3.6 ± 1.2	0.188	1.6 ± 0.1	0.310	5.2 ± 1.3	0.058
F2H2N2-HexNAcitol	G67999CW	1576.82	1576.83	139.7 ± 29.2	35.0 ± 2.7	90.0 ± 69.2	0.355	101.3 ± 39.4	0.117	41.1 ± 11.1	0.531	110.0 ± 37.7	0.085
F1H3N2-HexNAcitol	G94854LT	1606.83	1606.85	127.4 ± 37.6	14.0 ± 3.2	22.5 ± 16.5	0.544	22.8 ± 5.4	0.159	15.3 ± 3.7	0.757	49.5 ± 17.5	0.085

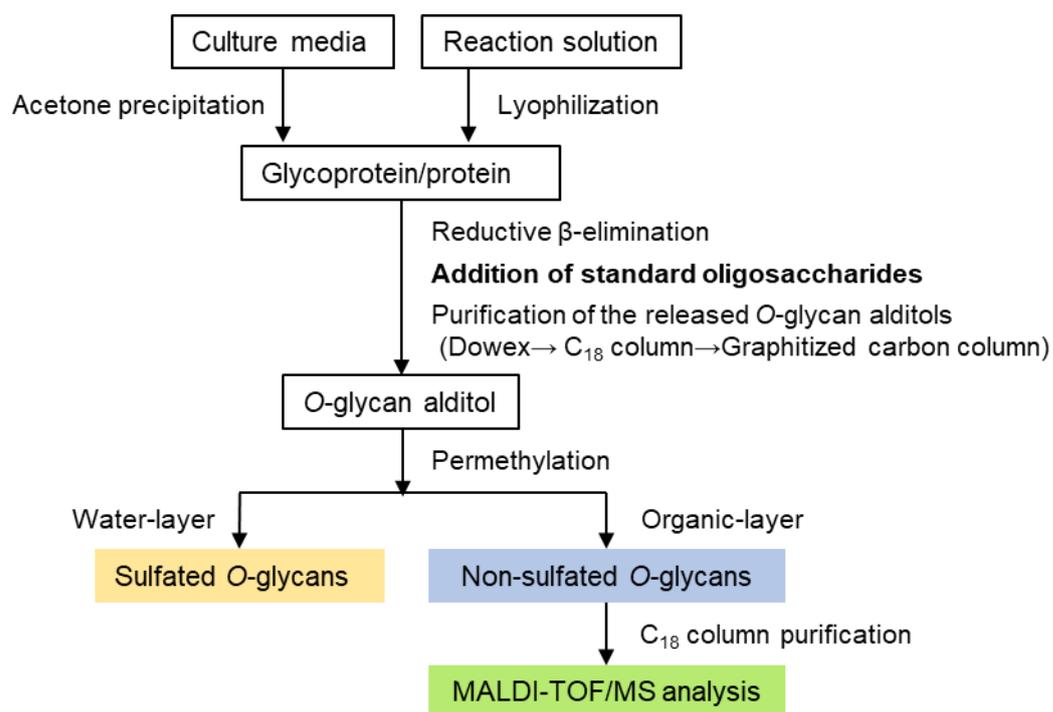
F1H2N3-HexNAcitol	G16143FT	1647.86	1647.86	748.9 ± 138.9	128.0 ± 9.5	391.9 ± 292.8	0.310	593.2 ± 209.4	0.078	151.2 ± 30.4	0.389	724.5 ± 206.2	0.046
H3N3-HexNAcitol	G78977TF	1677.91	1677.87	150.7 ± 28.6	10.3 ± 1.6	35.2 ± 24.3	0.259	52.7 ± 19.3	0.078	14.2 ± 3.7	0.288	33.1 ± 12.8	0.105
H2N4-HexNAcitol	G24646ZK	1718.89	1718.88	56.7 ± 2.4	5.7 ± 0.7	11.7 ± 7.2	0.334	75.4 ± 57.1	0.208	4.5 ± 1.4	0.364	13.5 ± 3.9	0.085
F2H3N2-HexNAcitol	G07869EJ	1780.92	1780.91	103.7 ± 29.2	2.6 ± 0.1	4.3 ± 2.9	0.497	3.6 ± 1.2	0.339	3.2 ± 0.5	0.240	8.8 ± 3.3	0.095
F2H2N3-HexNAcitol	G54543GL	1821.95	1821.93	82.1 ± 22.7	122.1 ± 12.4	171.4 ± 133.9	0.652	197.9 ± 73.0	0.259	149.3 ± 28.5	0.320	416.3 ± 140.0	0.081
F1H3N3-HexNAcitol	G49874UX	1851.93	1851.94	133.6 ± 21.4	53.9 ± 5.0	70.9 ± 62.3	0.745	84.8 ± 25.5	0.214	73.8 ± 17.7	0.240	211.0 ± 73.4	0.081
H4N3-HexNAcitol	G81295CK	1881.97	1881.94	19.8 ± 7.4	5.0 ± 1.7	7.0 ± 3.8	0.547	7.1 ± 1.9	0.351	4.9 ± 1.8	0.975	11.9 ± 3.7	0.116
F1H2N4-HexNAcitol	G68572BA	1892.98	1892.97	22.2 ± 4.1	10.9 ± 0.5	98.9 ± 92.0	0.288	163.5 ± 99.8	0.138	13.8 ± 3.3	0.310	63.9 ± 21.5	0.058
H3N4-HexNAcitol	G31936TA	1922.99	1922.95	124.7 ± 13.4	4.0 ± 0.4	11.2 ± 6.4	0.231	26.0 ± 12.2	0.102	4.1 ± 1.4	0.924	13.1 ± 3.5	0.055
F2H3N3-HexNAcitol	G51287LK	2026.05	2026.00	110.6 ± 21.1	13.7 ± 2.7	21.1 ± 18.1	0.621	23.9 ± 7.5	0.194	16.9 ± 4.5	0.458	64.5 ± 23.9	0.081
F1H4H3-HexNAcitol	G46687AB	2056.06	2055.99	23.1 ± 9.0	2.7 ± 0.7	3.6 ± 2.0	0.586	4.7 ± 1.7	0.240	3.0 ± 0.9	0.772	12.0 ± 5.5	0.117
F1H3N4-HexNAcitol	G10256JP	2097.08	2097.03	88.1 ± 19.6	9.4 ± 2.2	29.2 ± 28.1	0.401	51.5 ± 20.8	0.085	11.9 ± 3.0	0.420	84.2 ± 27.8	0.052
H3N5-HexNAcitol	G14260UH	2168.12	2168.06	63.7 ± 10.4	1.6 ± 0.6	2.8 ± 0.9	0.210	8.0 ± 3.3	0.090	1.1 ± 0.3	0.387	4.5 ± 1.7	0.124
F1H3N4-HexNAcitol	G10256JP	2271.17	2271.10	20.9 ± 7.0	45.1 ± 6.5	42.7 ± 38.6	0.929	39.6 ± 16.2	0.705	57.7 ± 15.4	0.381	182.9 ± 68.2	0.085
F3H4N3-HexNAcitol	G47448YK	2404.23	2404.15	36.0 ± 16.4	1.3 ± 0.8	2.0 ± 1.4	0.615	1.9 ± 0.6	0.544	1.7 ± 0.6	0.655	3.8 ± 1.3	0.128
F2H4N4-HexNAcitol	G70418MS	2475.27	2475.15	27.4 ± 3.0	1.9 ± 0.3	2.9 ± 2.3	0.626	2.6 ± 0.3	0.138	2.1 ± 0.5	0.732	11.6 ± 3.1	0.041
Total				41153.0 ± 16868.3	10114.3 ± 642.8	14753.4 ± 2592.0		19111.2 ± 1677.8		9489.5 ± 1949.6		19009.9 ± 2797.3	

*Abbreviation. NA: *N*-acetylneuraminic acid; F: fucose; H: hexose; N: *N*-acetylhexosamine; HexNAcitol: *N*-acetylhexosamine alditol.

**The ion peaks whose mean values were estimated to be larger than 10 pmol/100 ug PGM at least in one sample and whose glycosyl compositions were confirmed by MS/MS analysis are shown. The ion peaks at *m/z* 575, 738, 749, 912, 1188, 1362, 1637, 1706, 1747, 1765, 1985, 2155, 2506, 2632, 2649, 2661, 2679, 2854, and 2924 were unassigned as glycans.

Supplementary Table S4. GH84ホモログの相同性一覧

No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	<i>M. musculus</i>		100	99	58	31	33	34	22	22	24	22	22	22	24	35	34	34	31	33	33	29	
2	<i>H. sapiens</i>			99	58	31	33	34	22	22	24	22	22	22	24	35	34	34	31	33	33	29	
3	<i>R. norvegicus</i>				58	31	32	34	22	22	24	22	22	22	24	34	34	34	31	33	33	29	
4	<i>T. adhaerens</i>					32	30	32	20	20	25	20	24	22	21	32	31	30	29	29	29	27	
5	<i>P. rubens</i> Wisconsin 54-1255						33	34	25	25	25	25	23	25	27	35	35	35	34	34	34	37	
6	<i>S. pyogenes</i> M1 GAS SF370							37	24	24	23	24	24	20	27	33	32	34	34	32	32	32	
7	<i>T. terrenum</i> ATCC BAA-798								23	23	24	23	22	21	28	32	32	32	33	34	34	33	
8	<i>C. perfringens</i> ATCC13124 (NagH)									100	60	99	59	48	44	29	31	32	28	27	27	25	
9	<i>C. perfringens</i> CPN50 (NagH)										60	99	59	48	44	29	31	32	28	27	27	25	
10	<i>C. paraputrificum</i> M-21											60	64	48	37	29	33	30	27	28	28	27	
11	<i>C. perfringens</i> str. 13 (NagH)												59	48	44	29	32	33	29	27	27	25	
12	BbhIV													52	37	28	28	29	26	27	27	26	
13	BbhV														36	27	26	27	23	27	28	25	
14	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 (NagK)															39	38	38	35	32	33	35	
15	<i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-5482																92	89	60	45	45	43	
16	<i>B. caccae</i> ATCC 43185																	91	61	48	47	45	
17	<i>B. fragilis</i> NCTC 9343																		63	47	47	46	
18	<i>A. muciniphila</i> ATCC BAA-835																			46	47	43	
19	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 (NagJ)																					97	59
20	<i>C. perfringens</i> str. 13 (NagI)																						59
21	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 (NagI)																						



Supplementary Figure S1. ムチンO-結合型糖鎖の解析フロー

還元的β脱離反応によって糖鎖をアルジトール体として遊離させたのち、外部標準物質を添加した。完全メチル化した後、非硫酸化糖鎖についてMALDI-TOF/MS解析に供した。

謝辞

本学位論文作成にあたり、ご指導を賜りました京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学分野 片山高嶺 教授に心よりお礼申し上げます。糖鎖分析技術や組換えタンパク質の特異性解析などの実験手技についてご教示くださいました京都大学生命科学研究科同分野 加藤紀彦 助教(現准教授)にお礼申し上げます。

本学位論文執筆にあたり多大なご配慮を賜りました京都大学大学院生命科学研究科生体システム学分野 木村郁夫 教授に心からの謝意を表します。

研究活動を行う上でのルールや気を付けるべき点について非常に細やかに少しずつ時間をかけて教えていただきました京都大学大学院生命科学研究科ヒト常在性ビフィズス菌(HRB)講座 阪中幹祥 特任准教授にお礼申し上げます。阪中特任准教授には、ビフィズス菌の遺伝子組み換えについて知見や助言を頂くと共に、破壊用プラスミド pMSK151およびpMSK207を分与頂きました。第二章で使用したテトラサイクリン耐性のプラスミドpMSK219は、森永乳業株式会社基礎研究所グループ長兼京都大学大学院生命科学研究科ヒト常在性ビフィズス菌(HRB)講座 小田巻俊孝 准教授と阪中特任准教授にご恵与いただきました。重ねてお礼申し上げます。

先生方がご不在の際に分からない点を丁寧に教えていただいた京都大学大学院農学研究科 杉山友太 博士(現群馬大学食健康科学教育研究センター助教)にお礼申し上げます。群馬大学に着任以降も、幾度も電話等で相談にのっていただきました。ありがとうございました。

MALDI-TOF/MSの管理をしていただきました京都大学大学院生命科学研究科 中野雄司 教授、京都大学大学院農学研究科 伊福健太郎 教授に感謝いたします。本論文は、MALDI-TOF/MSのデータが根幹となっており、中野先生や伊福先生のご協力のおかげで論文執筆ができました。

ビフィズス菌-大腸菌シャトルベクターpKKT427を恵与していただきました岐阜大学農学部 故鈴木徹 教授、BbhI発現プラスミドを恵与していただきました近畿大学生物理工学部 芦田久 教授、組換え酵素BbhIを発現・精製していただいた京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学分野 後藤愛那 博士研究員(現製薬会社勤務)、培地や抗生物質などの共通試薬類を作製いただいた京都大学大学院生命科学研究科HRB講座技術補佐員 和田千夏 氏に感謝いたします。精製lacto-N-triose IIを恵与して下さいました京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学 木村早希 氏(令和2年修了)にお礼申し上げます。

研究活動に必要な経理や事務など多方面にわたってサポートをしていただきました京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学分野技術補佐員 清水久美子 氏に感謝いたします。

学部生の頃より、私の可能性を信じ、いつも応援していただいた竹中育英会大阪事務局のみなさまにお礼申し上げます。竹中育英会の経済的な支援なしに博士課程への進学はあり得ませんでした。

また、特別研究員(DC2)に採用していただきました日本学術振興会に感謝いたします。

最後に、応援してくれた家族にお礼を申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Hiromi Takada, Toshihiko Katoh, Mikiyasu Sakanaka, Toshitaka Odamaki, and Takane Katayama.
GH20 and GH84 β -*N*-acetylglucosaminidases with different linkage specificities underpin mucin
O-glycan breakdown capability of *Bifidobacterium bifidum*.
Journal of Biological Chemistry, 299 (6) : 104781, 2023.

また、以下の論文を参考論文とした。

Hiromi Takada, Toshihiko, and Takane Katayama.
Sialylated *O*-glycans from hen egg white ovomucin are decomposed by mucin-degrading gut
microbes.
Journal of Applied Glycobiology, 67(2) : 31-39, 2020.