

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	高田 紘翠
論文題目	<i>Bifidobacterium bifidum</i> 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		
(論文内容の要旨)			
<p>腸内細菌およびその代謝物は、宿主の健康維持や疾病発症に大きく関与している。そのため、腸内細菌と宿主間の共生を支える分子機序を理解することは極めて重要な課題であるが、腸内細菌叢が如何にして形成され維持されてい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細菌種構成の変化に影響を与える物質としては、これまで食餌に含まれる植物由来の難消化性多糖に着目した研究が多く報告されているが、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の糖鎖(O-結合型糖鎖)に着目した。すなわち、ムチン資化性細菌である <i>Bifidobacterium bifidum</i> をモデルとして、腸内細菌による O-結合型糖鎖の分解様式を理解することを試みた。</p> <p>消化管に発現するムチンの 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が、還元末端側は主に 4 種の core 構造で形成されている。このうち、回腸および結腸由来糖鎖においては、それぞれ core 4 [GlcNAcβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAcα-O-Ser/Thr]および core 2 [Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAcα-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\rightarrow6)-GlcNAc 結合を切断する酵素が未同定であった。そこでデータベース検索や転写解析等から予測した 2 種の glycoside hydrolase family 84 (GH84)酵素(BbhIV および BbhV)と共に、既報の GH20 β-N-acetylglucosaminidase (BbhI)を組換え酵素として精製し、天然オリゴ糖やブタ胃ムチン(porcine gastric mucin, PGM)を基質とした特異性解析を行った。その結果、GH84 BbhIV が core 2 および core 4 構造中の β-(1\rightarrow6)-GlcNAc 結合を切断すること、また GH20 BbhI は大腸全体において発現している core 3 構造[GlcNAcβ1-3GalNAcα-O-Ser/Thr]に作用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 <i>bbhI/bbhIV</i> 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 <i>bbhIV</i> 欠損株および <i>bbhI/bbhIV</i> 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 から還元的 β-脱離反応によって遊離させた alditol オリゴ糖の半定量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。すなわち、<i>bbhI</i> 欠損株および <i>bbhIV</i> 欠損株では、それぞれ β-(1\rightarrow3)-GlcNAc 結合および β-(1\rightarrow6)-GlcNAc 結合が分解されずに残されていた。次に、PGM からの単糖遊離能について調べると、Fuc や NeuAc 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、<i>bbhIV</i> 欠損株および <i>bbhI/bbhIV</i> 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 構造だけでなく糖鎖伸長部分の N-acetyllactosamine 構造や β-(1\rightarrow6)-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 <i>bbhI/bbhIV</i> 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を培養した際と比較して長鎖の糖鎖構造が有意に蓄積していた。更に、ムチン糖鎖分解能を有さない <i>Bifidobacterium breve</i> を PGM 存在下で <i>B. bifidum</i> と共培養しところ、<i>B. bifidum</i> 野生株と比べて <i>bbhI/bbhIV</i> 二重欠損株では <i>B. breve</i> の生育度が大きく減少していた。以上のことから、BbhI および BbhIV は <i>B. bifidum</i> 自身によるムチン糖鎖利用のみならず、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いて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、少なくとも <i>B. bifidum</i> 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。系統樹解析の結果、GH84 酵素は細菌間あるいは宿主-細菌間の水平伝播によって多岐にわたる機能を獲得してきた可能性が推察された。</p> <p>以上、本研究は、ムチン資化性菌 <i>B. bifidum</i> による O-結合型糖鎖の分解機序およびそれが腸内細菌叢形成に与える影響を理解する上で重要な知見を提供した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

腸内細菌と宿主の共生は宿主の健康を支える上で重要であり、その関係性の破綻は様々な疾患を引き起こす。これまでに、疾患発症や免疫制御に関わる様々な腸内細菌種やその代謝物が同定されているが、腸内細菌叢が如何に形成され、また維持されているかについては不明な点が多く残されている。腸内細菌叢の形成や組成に影響を与える物質として、これまでに食餌由来の難消化性食物繊維に着目した研究が多く行われてきたが、本研究では宿主自身が腸管内に分泌するムチン糖タンパク質の糖鎖(ムチン O-結合型糖鎖)に着目した。元来、腸管ムチン層は上皮細胞と腸内細菌の直接的な接触を避けるためのバリアとして機能すると考えられてきたが、近年の研究によって一部の腸内細菌がムチン O-結合型糖鎖を資化可能であることが明らかとなったためである。しかしながら、腸内細菌によるムチン O-結合型糖鎖の分解に関わる糖質分解酵素(glycoside hydrolase, GH)の研究は、殆どの場合がデータベースを活用したホモログ解析や人工基質を用いた活性の確認にとどまっております、詳細な結合特異性解析や欠損株を用いた表現型解析を行った例は極めて少ない。これはムチン O-結合型糖鎖の構造が複雑で不均一であるために解析が困難であることが主な理由である。

本研究は、ムチン資化性細菌の1種として知られる*Bifidobacterium bifidum* をモデルとし、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析計を駆使した半定量グライコムクス解析技術によって、ムチンO-結合型糖鎖が腸内細菌によってどのように分解されるかを調査したものである。特に、ヒトの回腸や結腸においてそれぞれ特異的に発現しているムチンcore 4構造[GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -O-Ser/Thr]およびcore 2構造[Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -O-Ser/Thr]構造に存在する β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc結合、また大腸全体に発現するcore 3構造[GlcNAc β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr]に見られる β -(1 \rightarrow 3)-GlcNAc結合に作用する β -N-acetylglucosaminidaseに着目した研究を行った。転写量解析に続き、調製した精製酵素、および作製した遺伝子欠損株を天然オリゴ糖やムチン糖タンパク質に作用させ、グライコムクス解析を行った結果、 β -(1 \rightarrow 3)-GlcNAc結合および β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc結合に特異的な酵素としてそれぞれ、GH family 20に属するBbhI、およびGH family 84に属するBbhIVを同定した。また、ムチン糖タンパク質を添加した培地中で他細菌種との共培養を行うことで、それら酵素がムチンO-結合型糖鎖を介した細菌間クロスフィーディングに重要な役割を果たすことも明らかとした。すなわち、腸内細菌によるムチンO-結合型糖鎖の分解様式について、および、その分解が腸内細菌叢形成に与えると考えられる効果について重要な知見を提供した。また、本研究は腸内細菌によるムチンO-結合型糖鎖分解機序の解析法として新しいフレームワークを提供した点でも評価できる。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、糖鎖生物学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見もしくは概念等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されていた。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和5年6月8日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日