

博士論文

腸内でビフィズス菌を選択的に増殖させる
次世代型プレバイオティクスの開発

2022 年

石川県立大学大学院
生物資源環境学研究所
生物機能開発科学専攻

平野 里佳

目次

第一部	緒言	1
第二部	実験方法	
第一節	使用した糖	4
第二節	使用菌株	5
第三節	培地の調製	
第一項	GAM without sugar medium (GAM-wos)	10
第二項	modified MRS without sugar medium (mMRS-wos)	10
第三項	糖溶液	10
第四節	次世代型プレバイオティクスのスクリーニング	11
第五節	基質結合タンパク質をコードする遺伝子の挿入変異株の作製	12
第六節	ビフィズス菌の培養条件	14
第七節	BL105A_0502 の保存性解析	14
第八節	<i>C. difficile</i> と <i>B. infantis</i> の共培養	15
第九節	糞便細菌共存下における <i>C. difficile</i> と <i>B. infantis</i> の共培養	
第一項	ヒト糞便検体	16
第二項	糞便培養	16
第十節	マウス感染実験	
第一項	<i>C. difficile</i> 芽胞溶液の調製	17
第二項	<i>B. infantis</i> の凍結乾燥菌体の調製	17
第三項	マウスへの菌の投与	17
第四項	マウス糞便中の細菌 DNA の定量	18
第十一節	統計解析	19
第三部	実験結果	
第一節	既存のプレバイオティクスはヒト腸内細菌叢に含まれる複数の日和見菌の生育を促進する	20
第二節	次世代型プレバイオティクス候補物質 Gal- β 1,4-Rha は、ビフィズス菌特異的な増殖促進効果を持つ	23
第三節	<i>B. longum</i> が Gal- β 1,4-Rha を炭素源として利用するためには BL105A_0502 が必要である	25
第四節	ヒトの腸内細菌が Gal- β 1,4-Rha を利用するためには、BL105A_0502 ホモログが必要である	28

第五節	<i>In vitro</i> において <i>B. infantis</i> は <i>C. difficile</i> の生育を抑制する	30
第六節	Gal- β 1,4-Rha 含有培地における <i>B. infantis</i> による <i>C. difficile</i> の生育抑制には、BL105A_0502 のホモログである BLIJ_2090 が必要である	31
第七節	Gal- β 1,4-Rha と <i>B. infantis</i> が <i>C. difficile</i> の毒素産生を阻害する	33
第八節	<i>In vivo</i> における <i>C. difficile</i> の生育抑制試験	37
第四部	考察	41
参考文献		48
関連論文		56
謝辞		57

第一部 緒言

近年のメタゲノミクス研究に基づくと、ヒトの腸内細菌は数千種存在することが推測されている(1)。ヒトは複雑な腸内細菌叢を保持しており、腸内細菌叢にふくまれる細菌の数は宿主であるヒトの細胞数に匹敵する(2)。この腸内細菌叢の組成とヒト健康には深い関係があることが近年の腸内細菌分野の研究の発達とともに明らかとなってきている。例えば、特定の疾患の罹患者や表現型のヒト (1型糖尿病(3)、2型糖尿病(4)、肥満(5)、クローン病(6, 7)、肝硬変(8)) の腸内細菌叢に特徴的に割合が変化する細菌種があることが複数報告されている。このように、ヒトと健康を考える上で腸内細菌は切り離せない存在となっている。

腸内細菌叢を構成する細菌として、健康増進効果をもつ「善玉菌」、疾患の原因となる「悪玉菌」、急性疾患の原因にはならず健康増進効果も特定されていないため、その機能が研究の途上にある「日和見菌」が存在する。2010年にヒト腸内に常在する腸内細菌のうち、最優勢の56種が培養を介さない手法を用いて報告され、これらの多くが「日和見菌」であることが明らかとなった(9)。

プロバイオティクスとは、腸内環境を改善するために摂取される生菌であり、乳酸菌やビフィズス菌がプロバイオティクスとして使用されている。一方

で、プレバイオティクスは「a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit. (宿主の微生物が選択的に利用することで、健康上の利益をもたらす基質)(10)」と定義されており、腸内細菌叢を制御することのできる市販の成分として広く使用されている。

これまでに、いくつかのプレバイオティクスやプレバイオティクス候補物質がいくつかの日和見菌の生育を促進することが報告されてきた(11, 12)。また、日和見菌の一部は自己免疫疾患の原因菌である疑いがあること(13)、食物繊維が不足した食餌を摂取したマウスの腸管バリア機構を破壊すること(14)などが報告されている。そこで、腸の健康を維持し、腸疾患を予防するためには、ヒトに有益な影響を与える細菌やプロバイオティクス細菌の増殖を特異的に促進することのできる「次世代型プレバイオティクス」の開発が必要とされる。

偽膜性腸炎は、一般的に抗生物質の使用と関連して発症する疾患である。腸内細菌叢が乱れると *Clostridioides difficile* が腸内に定着し、毒素を産生することで最終的に炎症が引き起こされる。*C. difficile* は、米国の急性期病院における医療関連感染症の最も一般的な病原体である(15)。*C. difficile* 関連感染症の治療法として、メトロニダゾールやフィダキソマイシン、バンコマイシンの投与が行われているが、反復感染が起きるケースが多々ある(16)。近年では、再発性偽膜性腸炎の有効な治療法として、健康なドナーから採取した糞便を患者の

腸管に移植する「糞便移植」が推奨されている(16)。しかしながら、糞便移植によって肥満となった例(17)や、移植後に広域スペクトラム β -ラクタマーゼ産生大腸菌に感染し、患者が死亡した例(18)等が報告されている。これに代わる治療法として、プロバイオティクス細菌の投与が研究されているが、これまでに再現性のある有効な効果を示した臨床試験は報告されていない(16)。

本研究では、日和見菌や病原菌の増殖を促進せず、有用腸内細菌やプロバイオティクス細菌の増殖を特異的に促進することのできる次世代型プレバイオティクスを開発することを目的として、各細菌の糖質利用能を試験することにより、酵素合成されたオリゴ糖を含む様々な構造の β -ガラクトシドのスクリーニングを行った。次いで、次世代型プレバイオティクス候補物質によるビフィズス菌特異的な増殖促進に必要な遺伝子を同定した。さらに、得られた次世代型プレバイオティクス候補物質とビフィズス菌の組み合わせによる *C. difficile* の生育抑制を目的とした、共培養試験、糞便培養試験およびマウスを用いた動物実験を行った。

第二部 実験方法

第一節 使用した糖

Galactosyl- β 1,3-*N*-acetylglucosamine (LNB)(19)、Galactosyl- β 1,3-glucose (Gal- β 1,3-Glc)(20)、Galactosyl- β 1,3-galactose (Gal- β 1,3-Gal)(20)、Galactosyl- β 1,3-*N*-acetylgalactosamine (GNB)(21)及び Galactosyl- β 1,4-L-rhamnose (Gal- β 1,4-Rha)(20)は、既報のように合成したものを国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所の西本完博士ならびに北岡本光博士（現、新潟大学農学部）より供与いただいた。

Galactosyl- β 1,4-glucose (Lactose) は、ナカライテスク株式会社より購入した。Lactulose、raffinose、GOS、FOS は、富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。1-Kestose は、東京化成工業株式会社より購入した。

特に、次世代型プレバイオティクス候補物質のスクリーニングに使用した β -ガラクトシドを Table 2-1-1 に示した。

Table 2-1-1 次世代型プレバイオティクス候補物質のスクリーニングに使用した β -ガラクトシド

糖質	スクリーニング結果
Gal- β 1,4-Rha	Figure 3-1f
LNB	Figure 3-2a
Gal- β 1,3-Glc	Figure 3-2b
Gal- β 1,3-Gal	Figure 3-2c
GNB	Figure 3-2d
Lactose	Figure 3-2e

第二節 使用菌株

分譲されている菌株は American Type Culture Collection (ATCC)、German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DSMZ)、Japan Collection of Microorganisms (JCM) から入手した。本研究で使用した菌株を Table 2-2-1、Table 2-2-2、Table 2-2-3、Table 2-2-4、Table 2-2-5 に示した。また、本研究で用いた遺伝子変異株の変異遺伝子の特徴を Table 2-2-6 に示した。

細菌の培養は、37°Cの嫌気チャンバー (InvivoO2 400, Ruskinn Technology) を用いて 10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂ の雰囲気中で行った。

Table 2-2-1 次世代型プレバイオティクスのスクリーニングに用いた腸内常在菌叢最優勢種

	SOURCE	IDENTIFIER
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	JCM	JCM 5827 ^T
<i>Bacteroides uniformis</i>	JCM	JCM 5828 ^T
<i>Bacteroides vulgatus</i>	JCM	JCM 5826 ^T
<i>Bacteroides caccae</i>	JCM	JCM 9498 ^T
<i>Bacteroides ovatus</i>	JCM	JCM 5824 ^T
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	JCM	JCM 15633 ^T
<i>Bacteroides dorei</i>	JCM	JCM 13471 ^T
<i>Bacteroides stercoris</i>	JCM	JCM 9496 ^T
<i>Bacteroides finegoldii</i>	JCM	JCM 13345 ^T
<i>Bacteroides intestinalis</i>	JCM	JCM 13265 ^T
<i>Bacteroides fragilis</i>	JCM	JCM 11019 ^T
<i>Parabacteroides distasonis</i>	JCM	JCM 5825 ^T
<i>Parabacteroides merdae</i>	JCM	JCM 9497 ^T
<i>Dorea longicatena</i>	DSMZ	DSM 13814 ^T
<i>Dorea formicigenerans</i>	ATCC	ATCC 27755 ^T
<i>Parabacteroides johnsonii</i>	JCM	JCM 13406 ^T
<i>Coprococcus comes</i>	ATCC	ATCC 27758 ^T
<i>Ruminococcus torques</i>	ATCC	ATCC 27756 ^T
<i>Ruminococcus lactaris</i>	ATCC	ATCC 29176 ^T
<i>Ruminococcus gnavus</i>	ATCC	ATCC 29149 ^T
<i>Collinsella aerofaciens</i>	JCM	JCM 7790
<i>Blautia hansenii</i>	JCM	JCM 14655 ^T
<i>Eubacterium ventriosum</i>	ATCC	ATCC 27560 ^T
<i>Clostridium nexile</i>	ATCC	ATCC 27757 ^T
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	ATCC	ATCC 700802
<i>Roseburia intestinalis</i>	DSMZ	DSM 14610 ^T
<i>Clostridium asparagiforme</i>	DSMZ	DSM 15981 ^T

^T Type strain

Table 2-2-2 次世代型プレバイオティクスのスクリーニングに用いた病原菌株

	SOURCE	IDENTIFIER
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM	JCM 1290 ^T
<i>Clostridioides difficile</i>	JCM	JCM 1296 ^T

^T Type strain**Table 2-2-3 次世代型プレバイオティクスのスクリーニングに用いた乳酸菌株**

	SOURCE	IDENTIFIER
<i>Lactocaseibacillus casei</i>	JCM	JCM 1134 ^T
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	ATCC	ATCC 7469 ^T
<i>Lactobacillus paragasseri</i>	JCM	JCM 1130
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	JCM	JCM 8794
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	JCM	JCM 1149 ^T
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	JCM	JCM 1158
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> subsp. <i>reuteri</i>	JCM	JCM 1112 ^T
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	JCM	JCM 6124 ^T

^T Type strain**Table 2-2-4 次世代型プレバイオティクスのスクリーニングに用いた
ビフィズス菌株**

	SOURCE	IDENTIFIER
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	JCM	JCM 1254
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	JCM	JCM 1217 ^T
<i>Bifidobacterium breve</i>	JCM	JCM 1192 ^T
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	JCM	JCM 1200 ^T
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	JCM	JCM 1275 ^T
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	JCM	JCM 10602 ^T
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	JCM	JCM 1194 ^T
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	JCM	JCM 1205 ^T
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	JCM	JCM 1222 ^T

^T Type strain

Table 2-2-5 本研究において用いた遺伝子変異ビフィズス菌株とその野生株

	SOURCE	IDENTIFIER
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> 105-A	JCM	JCM 31944
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_0501</i> ::pRH4	This study (22)	N/A
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_1817</i> ::pRH7	This study	N/A
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_1867</i> ::pRH8	This study	N/A
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_1888</i> ::pRH9	This study	N/A
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_1890</i> ::pRH10	This study	N/A
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_1896</i> ::pRH11	This study	N/A
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_0201</i> ::pRH2	This study	N/A
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_0500</i> ::pRH3	This study (22)	N/A
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_1223</i> ::pRH6	This study	N/A
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_0502</i> ::pRH5	This study (22)	N/A
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_1817</i> ::pRH7	This study	N/A
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A Δ <i>bl105A_1604</i>	(23), * ¹	N/A
pMC25/ <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> strain 105-A <i>bl105A_0502</i> ::pRH5 (<i>bl105A_0502</i> 相補株)	(22), * ²	N/A
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	JCM	JCM 1222 ^T
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 1222 ^T <i>blij_2090</i> ::pRH12	This study	N/A

^T Type strain

*¹ 京都大学 阪中幹祥准教授より供与して頂いた。

*² 京都大学 片山高嶺教授より供与して頂いた。

Table 2-2-6 遺伝子変異株の変異遺伝子の特徴または推定基質

遺伝子	特徴/推定基質	引用文献
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>		
<i>bll105A_0201</i>	ABC transporter substrate binding component	NCBI* ¹
<i>bll105A_0500</i>	galacto-oligosaccharides	(24, 25)
<i>bll105A_0501</i>	solute-binding protein of the ABC-type sugar transport system	NCBI* ¹
<i>bll105A_0502</i>	ABC transporter solute-binding protein	NCBI* ¹
<i>bll105A_1223</i>	sugar-binding protein	NCBI* ¹
<i>bll105A_1604</i>	galacto- <i>N</i> -biose/lacto- <i>N</i> -biose I	(26)
<i>bll105A_1817</i>	ABC transporter substrate-binding protein	NCBI* ¹
<i>bll105A_1867</i>	ABC transporter substrate binding component	NCBI* ¹
<i>bll105A_1888</i>	melezitose	(27)
<i>bll105A_1890</i>	solute binding protein of ABC transporter system for sugars	NCBI* ¹
<i>bll105A_1896</i>	raffinose, stachyose, melibiose	(27)
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>		
<i>blij_2090</i>	sugar ABC transporter substrate binding component	KEGG* ²

*¹ *B. longum* 105-A 株のゲノム情報 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP014658>) 中の該当の locus tag を検索し、product 欄の情報を特徴として示した。

*² *B. infantis* JCM 1222 株のゲノム情報 (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=T02092) で BLIJ_2090 を検索し、Definition の欄の情報を特徴として示した。

第三節 培地の調製

第一項 GAM without sugar medium (GAM-wos)

GAM 糖分解用半流動培地 (日水製薬株式会社) を製品指示書に従って溶解した後、ろ過し、寒天を取り除いた。オートクレーブ滅菌 (115 °C、15 分) した後、直ちに、アネロパックケンキ (三菱ガス化学株式会社) と共に密封容器に入れ、一晩以上放置することで酸素を除去した。

第二項 modified MRS without sugar medium (mMRS-wos)

mMRS-wos は以下のように調製した : de Man, Rogosa, and Sharpe medium (28)の組成からグルコースを取り除いた培地をオートクレーブ滅菌 (121 °C、15 分) し、終濃度 0.34% (w/v) で sodium ascorbate を、終濃度 0.02% (w/v) で cysteine-HCl を添加した。

第三項 糖溶液

MilliQ 水をオートクレーブ滅菌 (121 °C、20 分) した後、直ちに、アネロパックケンキ (三菱ガス化学株式会社) と共に密封容器に入れ、一晩以上放置することで酸素を除去した。嫌気チャンバー内で糖質を嫌氣的に保存した水で溶解し、Millex (Merck KGaA) を用いてフィルター滅菌した。

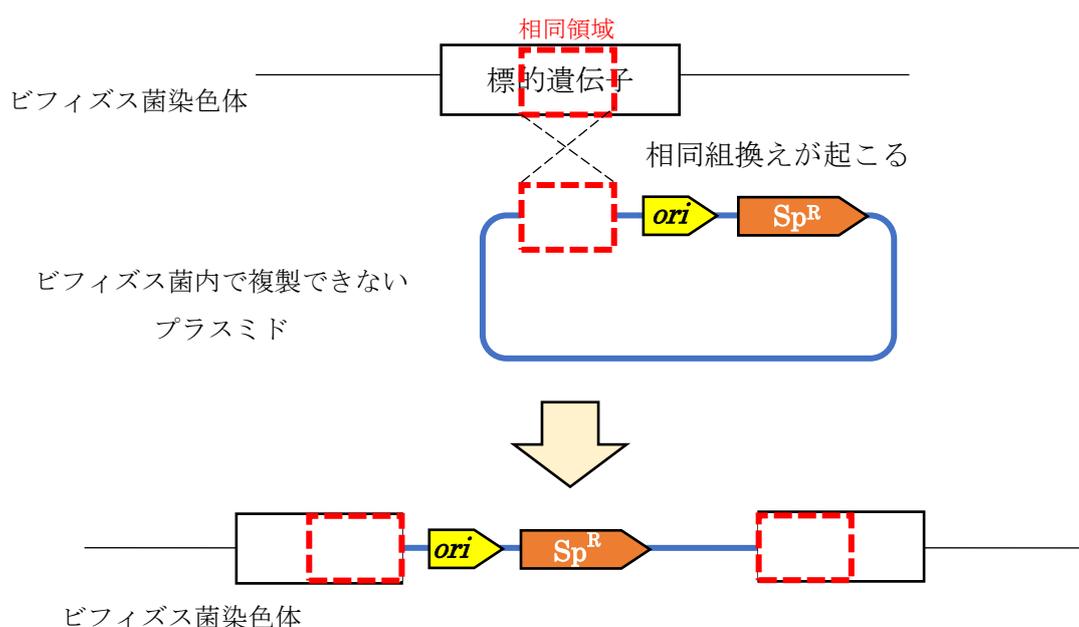
第四節 次世代型プレバイオティクスのスクリーニング

次世代型プレバイオティクスのスクリーニングを目的とした細菌の培養は、既報の方法(29)に従って行った。簡潔に述べると、グリセロールストックの状態
で凍結保存されていた腸内細菌株を 96 ディープウェルプレート中の GAM 培地
(日水製薬株式会社) に接種し、37°C で 1~2 日間嫌気培養を行い、前培養液を得
た。得られた前培養液をコピープレートスタンド (Tokken) を用いて 96 ディー
プウェルプレート中の各糖質を終濃度 0.5% (w/v) でとなるように添加した
GAM-wos 500 μ L 中に接種した。24 時間嫌気培養した後、各細菌の生育を 600 nm
の光学密度 (OD₆₀₀) として測定した。各細菌の糖質利用能を比較するため、糖質
を添加した培地での細菌の生育度 (OD₆₀₀ in GAM-wos supplemented with sugar)
を、糖質を添加していない培地での生育度 (OD₆₀₀ in GAM-wos) で割り、OD₆₀₀
の比を求めた。

$$\text{Ratio of OD}_{600} (\%) = \frac{\text{OD}_{600} \text{ in GAM - wos supplemented with sugar}}{\text{OD}_{600} \text{ in GAM - wos}} \times 100$$

第五節 基質結合タンパク質をコードする遺伝子の挿入変異株の作製

既報において作製済みであった *Bifidobacterium longum* 105-A の遺伝子変異株 (23)に加え、本研究では推定基質結合タンパク質遺伝子にプラスミドを導入することにより、ビフィズス菌の遺伝子変異株を作製した(22)。*B. longum* 105-A および *B. infantis* JCM 1222^T への挿入変異は、既報で報告された手法(30)を用いてシングルクロスオーバーにより導入した (Figure 2-5-1)。



プラスミドが標的遺伝子に挿入された株が作製できる。

Figure 2-5-1 挿入変異株作製方法の概略図

標的推定基質結合タンパク質遺伝子内部の 497 bp を相同領域 (赤色) として決定した。

簡潔に述べると、変異導入用プラスミドは、基質結合タンパク質をコードする標的遺伝子の内部断片を pBS423 (31) の *Bam* HI 消化 DNA 断片 (pUC *ori* と Sp^r 遺伝子を含む断片) にクローニングすることで構築した。プラスミドの配列は、相同組み換えにより、ビフィズス菌の染色体上に組み込まれた。 *B. longum* 105-A (GenBank accession no. AP014658.1) (32) と *B. infantis* JCM 1222^T (accession no. AP010889.1) (33) のゲノム配列情報に基づいてプラスミドの構築・変異導入の確認を行った。使用したプライマーを Table 2-5-1 に示した。

Table 2-5-1 標的遺伝子の内部断片をクローニングするために用いたプライマー

Gene	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')
BL105A_0201	CCAGCTCAAGGGATCatatggaaggcaaggtcggc	CGGTACCCGGGGATCgtaagcgtccaagacgcct
BL105A_0500	CCAGCTCAAGGGATCtcgaggcaggctccgggtct	CGGTACCCGGGGATCggtcttgggtgcatgagat
BL105A_0501	CCAGCTCAAGGGATCaggctggctccgggtcctcg	CGGTACCCGGGGATCggtcttgggtgcatgagcaggc
BL105A_0502	CCAGCTCAAGGGATCcctatggactgccatggat	CGGTACCCGGGGATCggcgttggcaggctgccca
BL105A_1223	CCAGCTCAAGGGATCctgcccggcgaactgcc	CGGTACCCGGGGATCgagggcctccggcgggatg
BL105A_1817	CCAGCTCAAGGGATCcgatggtcaccaggctacc	CGGTACCCGGGGATCgtagccgccgtttagaagt
BL105A_1867	CCAGCTCAAGGGATCagaccgagcccccacccctg	CGGTACCCGGGGATCgtcgggtgatgtacaggtcga
BL105A_1888	CCAGCTCAAGGGATCcgacaacacctcccagcag	CGGTACCCGGGGATCagccttcacggcaccgtcgg
BL105A_1890	CCAGCTCAAGGGATCataatgtctctggacaaaatggccc	CGGTACCCGGGGATCggacgcagcgtcctcggcc
BL105A_1896	CCAGCTCAAGGGATCgcacccgttctgcaagaat	CGGTACCCGGGGATCgagctcggattccttctcga
BLIJ_2090	CCAGCTCAAGGGATCtctacgggctgccatggat	CGGTACCCGGGGATCggcattggcgggctgacca

ゲノム DNA をテンプレートとして PCR することで標的遺伝子の内部断片を得た。大文字は In-Fusion クローニングに使用した配列である。

第六節 ビフィズス菌の培養条件

ビフィズス菌株を GAM 寒天培地に接種し、37 °C で 1 日嫌気培養した (種培養)。種培養プレートから菌体を掻き取り、GAM 液体培地に接種し、37 °C で 12 時間嫌氣的に培養することで前培養液を得た。前培養液中の菌体を mMRS-wos を用いて 2 回洗浄した。洗浄した菌体を各糖質を終濃度 0.5% (w/v) となるように添加した mMRS-wos あるいは添加していない mMRS 中に初期 OD₆₀₀ が 0.02 となるように接種した。各細菌の生育度を OD₆₀₀ を指標として経時的に測定した。

第七節 BL105A_0502 の保存性解析

B. longum 105-A の BL105A_0502 のアミノ酸配列をクエリ配列として BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)(34) 検索を行い、ヒトに関連するビフィズス菌 12 種(35) (36)と腸内常在菌叢最優勢 56 種(9)のゲノムにおける BL105A_0502 配列の保存性を解析した。ビフィズス菌は基準株について、腸内常在菌叢最優勢 56 種は文献(9)で報告されていた分類単位について解析を行った。Blast スコアが 500 bit 以上の場合、BL105A_0502 が保存されている可能性が高いと判断した。

第八節 *C. difficile* と *B. infantis* の共培養

C. difficile JCM 1296^T と *B. infantis* (JCM 1222^T または BLIJ_2090 変異株) をそれぞれ GAM 寒天培地に画線し、37 °C で 48~60 時間嫌氣的に培養した。シングルコロニーを GAM 液体培地に接種し、37 °C で 24~26 時間嫌氣的に培養し、前培養液を得た。前培養液を Gal-β1,4-Rha またはグルコースを終濃度 0.5% (w/v) となるように添加した 500 μL の GAM-wos に接種した。各細菌株の初期 OD₆₀₀ は、*C. difficile* について 0.01、*B. infantis* 野生株について 0.001、*B. infantis* BLIJ_2090 変異株について 0.01 とした。培養 0、9、17、24 時間後に培養液を 10⁻¹ から 10⁻⁶ 倍まで PBS を用いて段階希釈し、クロストリジア測定用培地 (日水製薬株式会社) または GAM 寒天培地上に塗布した。寒天培地を 37 °C で 48 時間培養した後、CFU をカウントした。クロストリジア測定用培地上では、*C. difficile* は黒く大きなコロニーを、*B. infantis* は白いコロニーを形成した。GAM 寒天培地上では、*C. difficile* はクリーム色のコロニーを、*B. infantis* は白いコロニーを形成した。コロニー形状に基づく細菌種の推定の正確性を確認することを目的として、それぞれのプレートから各形状のコロニーを 4 つずつ選出し、既報で報告されていた方法に従って 16S rDNA シーケンス解析を行った(29)。コロニー形状から推定される細菌種と、寒天培地上のコロニーとの相同性は、16S rDNA 解析によって検証した。

第九節 糞便細菌共存下における *C. difficile* と *B. infantis* の共培養

第一項 ヒト糞便検体

本実験は石川県立大学 研究倫理委員会の承認のもと行われた。5 人の成人が糞便ドナーとして試験に参加した (3 males, 2 females; age: 25.6 ± 8.14 , range 21–40 years)。糞便検体は採便管を用いて採取し、検体の嫌気状態を維持するため、培養試験開始までは、アネロパックケンキと共に密封容器に入れて保管した。

第二項 糞便培養

C. difficile JCM 1296^T と *B. infantis* JCM 1222^T をそれぞれ GAM 寒天培地に画線し、37 °C で 48 時間嫌氣的に培養した。シングルコロニーを GAM 液体培地に接種し、37 °C で 24 時間嫌氣的に培養することで前培養液を得た。嫌気チャンバー内で滅菌済みの PBS を用いて糞便を 10 倍希釈 (w/v) した。前培養液を 96 穴ディーププレート中の Gal-β1,4-Rha を終濃度 0.5% (w/v) となるように添加した 500 μL の GAM-wos あるいは、添加していない 500 μL の GAM-wos に接種した。各細菌株の初期 OD₆₀₀ は、*C. difficile* について 0.01、*B. infantis* について 0.001、糞便懸濁液について 0.01 とした。48 時間培養後、ELISA kit (TGC-E001-1; tgcBIOMICS) を用いて培養上清中の CD 毒素 A および毒素 B の量を製品指示書に従って定量した。

第十節 マウス感染実験

第一項 *C. difficile* 芽胞溶液の調製

芽胞溶液の調製は、既報の方法(37)に従って行った。

第二項 *B. infantis* の凍結乾燥菌体の調製

B. infantis (JCM 1222^Tまたは BLIJ_2090 変異株) を GAM 寒天培地に画線し、37 °C で 2 日間嫌氣的に培養した。種培養プレートから菌体を掻き取り、GAM 液体培地に接種し、37 °C で 12 時間嫌氣的に培養することで前培養液を得た。3.5 mL の前培養液を 200 mL の GAM 液体培地に接種し、嫌氣的に 12 時間培養した。前培養液中の菌体を PBS を用いて洗浄した。洗浄した菌体を 10 mL の凍結乾燥用緩衝液 (3% (w/v) L-グルタミン酸ナトリウム、1.5% (w/v) リビトール、0.05% (w/v) システイン-HCl を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)) を用いて再懸濁し、凍結乾燥処理の直前まで-80 °C で予備凍結を行った。予備凍結後、凍結乾燥機 (FreeZone Plus 2.5 Liter Cascade Console Freeze Dry System; Labconco Corporation) を用いて凍結乾燥を 24 時間行った。

第三項 マウスへの菌の投与

マウスは、C57BL/6 JJcl (CLEA Japan Inc.) を用いた。湿度 50%、12 : 12 時間

の明暗周期の SPF 環境下で飼育した。餌は標準的な飼料 (CE-2, CLEA Japan Inc.) と水を自由摂取で与えた。動物の飼育および実験は、東京大学の「動物実験ガイドライン」に準拠し、東京大学医科学研究所の動物実験委員会の承認を得て行われた。菌体投与試験では、8 週齢の C57BL/6Jcl オスマウス (n=31) にバンコマイシン 0.5 g/L 及びフィニバックス 0.25 g/L を 12 日間飲水投与した。マウスを 5 群に分け、抗生物質投与終了の 1 日後に *C. difficile* の芽胞 (1.0×10^5 spores/day)、*B. infantis* (1.0×10^6 CFU/day)、および/または Gal- β 1,4-Rha (2g/kg bw/day) の経口投与を行った。一週間にわたって 2 日に一回の頻度でマウスの体重の測定、糞便の回収を行った (Figure 3-9)。イソフルラン麻酔下で頸椎脱臼によりマウスを安楽死させた。

第四項 マウス糞便中の細菌 DNA の定量

マウス糞便検体を Tris-EDTA buffer で懸濁した後、終濃度が 15 mg/mL となるようにリゾチームを加えた。次いで、終濃度 2000 U/mL となるようにアクロモペプチダーゼを加え、37 °C で 15 分間インキュベートした後に、終濃度 2 % (w/v) となるように SDS を加え、60 °C で 5 分間インキュベートした。その後、QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて糞便 DNA を抽出し、抽出した DNA を鋳型として定量 PCR に供した。細菌遺伝子のコピー数は、

SYBR Green システムキット (TB Green Premix Ex Taq II; Takara Bio) およびリアルタイム PCR 用サーマルサイクラー (StepOne™ Real-Time PCR System; Applied Biosystems) を用いて定量した。使用したプライマーを Table 2-10-1 に示した。サイクル条件を Table 2-10-2 に示した。

Table 2-10-1 qPCR による菌量の推定に使用したプライマー

配列(5'-3')	
<i>B. infantis</i> (beta galactosidase 42B gene) 京都大学 後藤愛那博士より頂いた	
Forward	gttctggggacaggagatga
Reverse	catgaagttcgtggtgaacg
<i>C. difficile</i> (16S rRNA gene) (38)	
Forward	ttgagcgatttacttcgtaaaga
Reverse	ccatcctgtactggctcacct

Table 2-10-2 Cycling stage

温度	時間	
95 °C	1 min	} 40 サイクル
95 °C	5 sec	
60 °C	30 sec	

第十一節 統計解析

統計解析は、BellCurve for Excel (株式会社社会情報サービス) を用いて行った。

第三部 実験結果

第一節 既存のプレバイオティクスはヒト腸内細菌叢に含まれる複数の日和見菌の生育を促進する

既存プレバイオティクスがヒト腸内細菌叢の増殖に及ぼす影響を調べることを目的として、購入可能なプレバイオティクスを添加した、あるいは添加しない GAM-wos を用いて善玉菌 (Table 2-2-3、Table 2-2-4)、病原菌 (Table 2-2-2)、ヒト腸内常在菌叢最優勢種 (Table 2-2-1) を培養した。ヒト腸内常在菌叢最優勢種については、GAM培地で培養可能であることが報告されている 32 種を用いた(29)。

しかしながら、そのうち 5 菌種 (*Ruminococcus obeum*、*Eubacterium siraeum*、*Pseudoflavonifractor capillosus*、*Clostridium scindens*、*Anaerotruncus colihominis*) は、GAM-wos 中での生育が安定しないために実験対象から除外した。試験した 5 つの既存プレバイオティクスおよびその候補物質 (raffinose、1-kestose、lactulose、galacto-oligosaccharides (GOS) および fructo-oligosaccharides (FOS)) のうち、全てが乳酸菌とビフィズス菌の増殖を促進した (Figure 3-1)。しかしながら、raffinose、1-kestose、lactulose、GOS、FOS はそれぞれ 4 種 (Figure 3-1a)、10 種 (Figure 3-1b)、8 種 (Figure 3-1c)、8 種 (Figure 3-1d)、7 種 (Figure 3-1e)の腸内常在菌叢最優勢種の増殖を 200%以上に促進した。また、1-kestose、lactulose、GOS は、ガス壊疽や食中毒の原因となる病原菌 *Clostridium perfringens* JCM 1290^T (Figure 3-1b、3-1c、3-1d) の増殖を促進した。さらに、1-kestose は病原菌 *C. difficile* JCM 1296^T

の増殖も促進した (Figure 3-1b)。

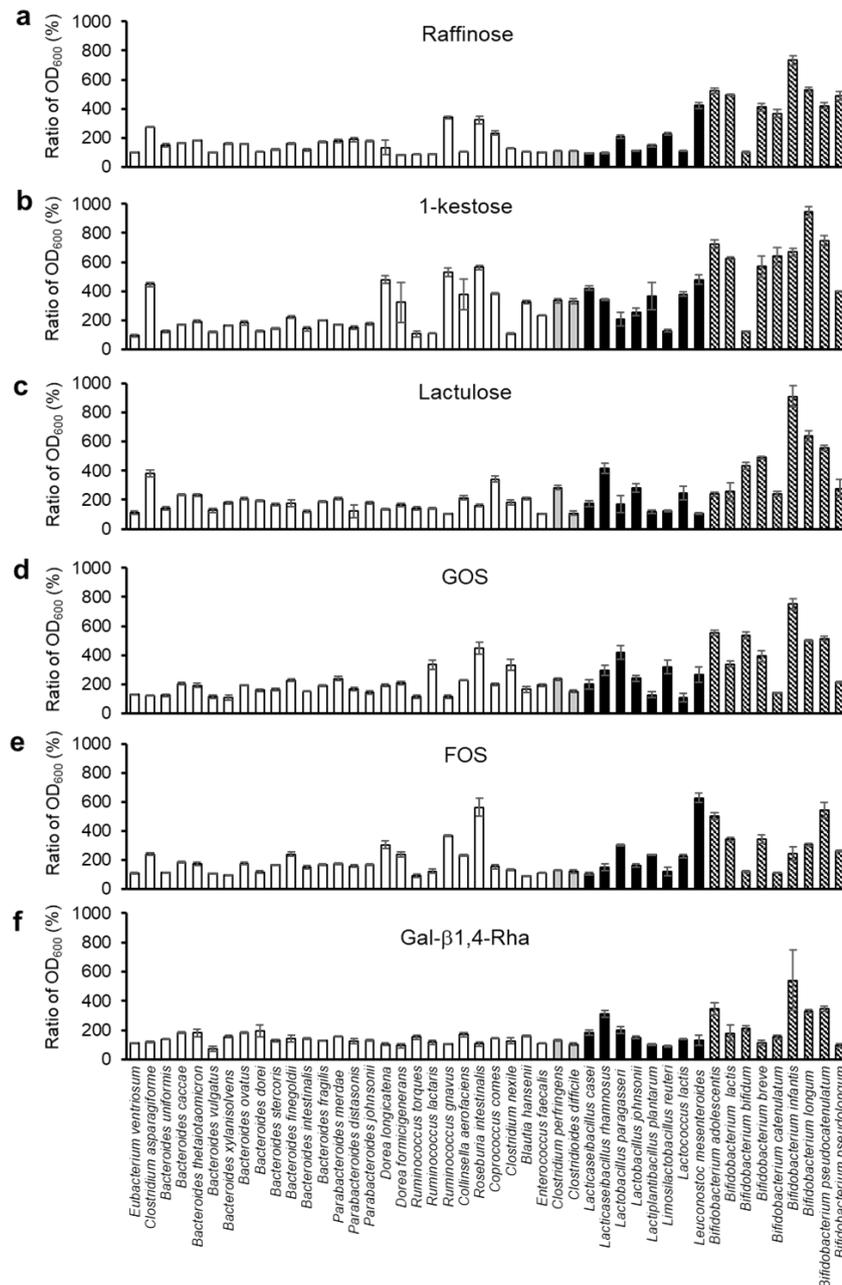


Figure 3-1 既存のプレバイオティクスと Gal-β1,4-Rha による有益な細菌とヒト腸内細菌叢優勢 27 菌種に対する生育促進効果

0.5% (w/v) のプレバイオティクスを添加した GAM-wos、または添加していない GAM-wos で、各細菌種を 24 時間培養した。OD₆₀₀ によって細菌の増殖を測定した。各細菌のプレバイオティクスによる増殖促進効果を比較することを目的として、糖を添加していない培地での生育度 (n = 3) で糖を添加した培地での生育度 (n = 3) を割ることにより増殖促進度 (Ratio of OD₆₀₀) を求めた。白：ヒト腸内細菌叢最優勢 27 種、灰：病原性細菌、黒：乳酸菌、縞：ビフィズス菌。GAM-wos にラフィノース (a)、1-ケーストース (b)、ラクチュロース (c)、GOS (d)、FOS (e)、Gal-β1,4-Rha (f) を添加した。データは平均値 ± 標準偏差で示した。

第二節 次世代型プレバイオティクス候補物質 Gal-β1,4-Rha は、ビフィズス菌特異的な増殖促進効果を持つ

次に、酵素合成により得た糖質 (galactosyl-β1,4-L-rhamnose (Gal-β1,4-Rha) (20) (39)、 galactosyl-β1,3- *N*-acetylglucosamine (LNB) (19)、 galactosyl-β1,3-glucose (Gal-β1,3-Glc) (20)、 galactosyl-β1,3-galactose (Gal-β1,3-Gal) (20)、 galactosyl-β1,3-*N*-acetylgalactosamine (GNB) (21))及びラクトースについて、腸内細菌に与える増殖促進効果を解析した (Table 2-1-1、 Figure 3-1f、 Figure 3-2)。 D-galactosyl-β1→4-L-rhamnose phosphorylase の逆反応により酵素合成した二糖である Gal-β1,4-Rha(20, 39)は、 *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (*B. infantis*) JCM 1222^T や *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* (*B. longum*) JCM 1217^T 等のビフィズス菌の増殖を選択的に促進した (Figure 3-1f)。また、乳酸菌 2 種の増殖も促進した (Figure 3-1f)。 Gal-β1,4-Rha による *C. perfringens* や *C. difficile*、腸内細菌叢最優勢種(9)に対する増殖促進値は 200%以下であった (Figure 3-1f)。

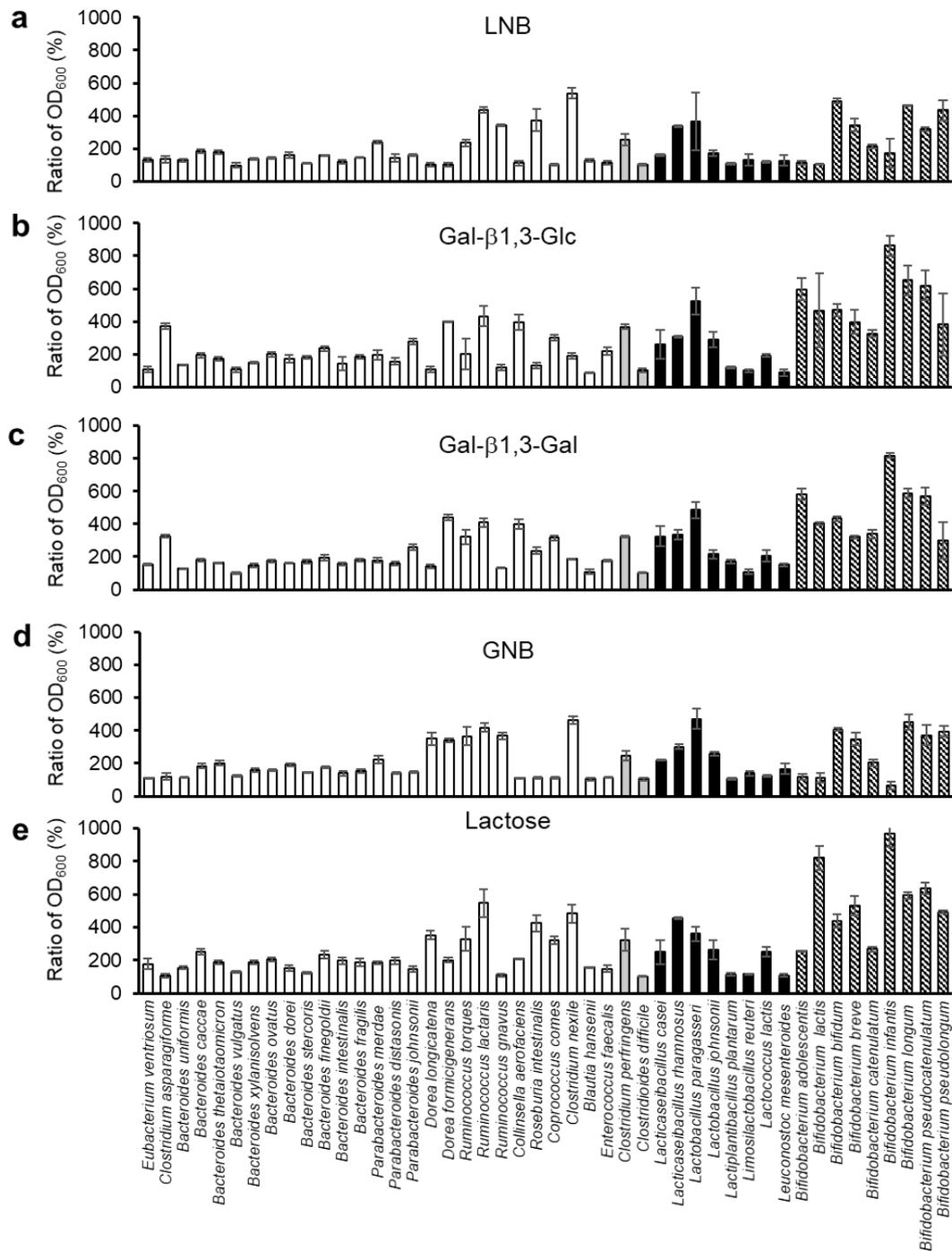


Figure 3-2 β-galactoside による有益な細菌とヒト腸内細菌叢優勢種 27 菌種に対する生育促進効果

0.5% (w/v) の糖質を添加した GAM-wos、または添加していない GAM-wos で、各細菌種を 24 時間培養した。OD₆₀₀ によって細菌の増殖を測定した。各細菌の糖質による増殖促進効果を比較することを目的として、糖を添加していない培地での生育度 (n = 3) で糖を添加した培地での生育度 (n = 3) を割ることにより増殖促進度 (Ratio of OD₆₀₀) を求めた。白：ヒト腸内細菌叢最優勢 27 種、灰：病原性細菌、黒：乳酸菌、縞：ビフィズス菌。GAM-wos に LNB (a)、Gal-β1,3-Glc (b)、Gal-β1,3-Gal (c)、GNB (d)、Lactose (e) を添加した。データは平均値±標準偏差で示した。

第三節 *B. longum* が Gal- β 1,4-Rha を炭素源として利用するためには BL105A_0502 が必要である

ビフィズス菌の選択的な増殖促進に重要な遺伝子を同定する目的で、遺伝子操作が容易な *B. longum* 105-A 株 (JCM 31944) (31, 40) を用いて実験を行った。*B. longum* は、糖質取り込みに様々な ABC トランスポーターを利用している (41)。そこで、11 種の糖質 ABC トランスポーターの基質結合タンパク質をコードする遺伝子をそれぞれ破壊した 11 株からなる *B. longum* 遺伝子変異株ライブラリを作成した (Table 2-2-5、Table 2-2-6)。Gal- β 1,4-Rha を単一炭素源として添加した modified MRS without sugar 培地 (mMRS-wos) を用いて *B. longum* の野生株および変異株をそれぞれ培養した (Figure 3-3a、Figure 3-3c) ところ、ほとんどの変異株は野生株と同等の生育を示した。しかしながら、BL105A_0502 (GenBank protein ID: BAP83151.1) 変異株は、野生株と比較して生育の遅れ及び低下がみられた。さらに、Gal- β 1,4-Rha を単一炭素源として添加した mMRS-wos で BL105A_0502 相補株を培養すると、BL105A_0502 遺伝子変異による生育遅延は見られなくなった (Figure 3-4a、Figure 3-4c)。一方で、ガラクトースを単一炭素源とする mMRS-wos で培養した場合には、BL105A_0502 変異株は野生株および相補株と同等の生育を示した (Figure 3-3b、Figure 3-3d、Figure 3-4b、Figure 3-4d)。これらの結果から、ABC トランスポーターの基質結合タンパク質である BL105A_0502 は、*B. longum* 105-A が Gal- β 1,4-Rha を利用する上で

重要な役割を担っており、Gal- β 1,4-Rha の輸送に寄与していると考えられた。

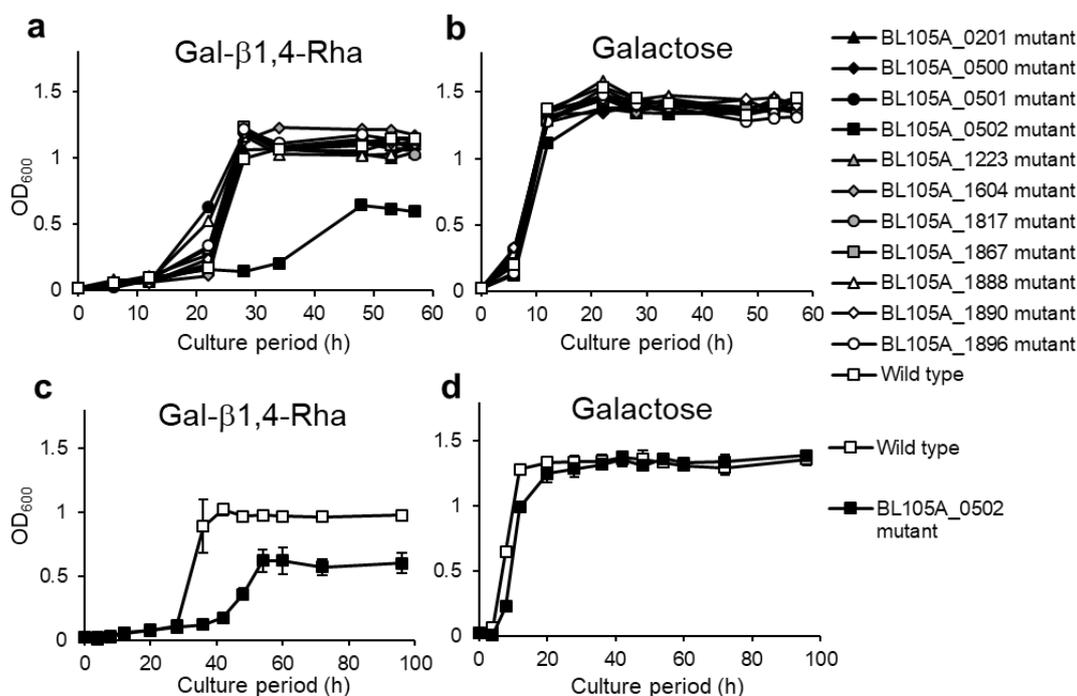


Figure 3-3 *B. longum* 105-A による Gal- β 1,4-Rha 利用における BL105A_0502 遺伝子の重要性

(a-b) 単一炭素源として 0.5% (w/v) Gal- β 1,4-Rha (a) または 0.5% (w/v) ガラクトース (b) を含む mMRS-wos における、*B. longum* 105-A 野生株および ABC トランスポーターの基質結合タンパク質をコードする遺伝子を破壊した変異株の生育曲線 ($n = 1$)。変異遺伝子を locus tag で示した。黒三角にて BL105A_0201 挿入変異株、黒菱形にて BL105A_0500 挿入変異株、黒丸にて BL105A_0501 挿入変異株、黒四角にて BL105A_0502 挿入変異株、灰三角にて BL105A_1223 挿入変異株、灰菱形にて BL105A_1604 欠損株、灰丸にて BL105A_1817 挿入変異株、灰四角にて BL105A_1867 挿入変異株、白三角にて BL105A_1888 挿入変異株、白菱形にて BL105A_1890 挿入変異株、白丸にて BL105A_1896 挿入変異株、白四角にて野生株の生育度をそれぞれ示した。(c, d) 単一炭素源として 0.5% (w/v) Gal- β 1,4-Rha (c) または 0.5% (w/v) ガラクトース (d) を含む mMRS-wos における *B. longum* 野生株 (白四角) および BL105A_0502 変異株 (黒四角) の生育曲線 ($n = 3$)。データは平均値±標準偏差で示した。

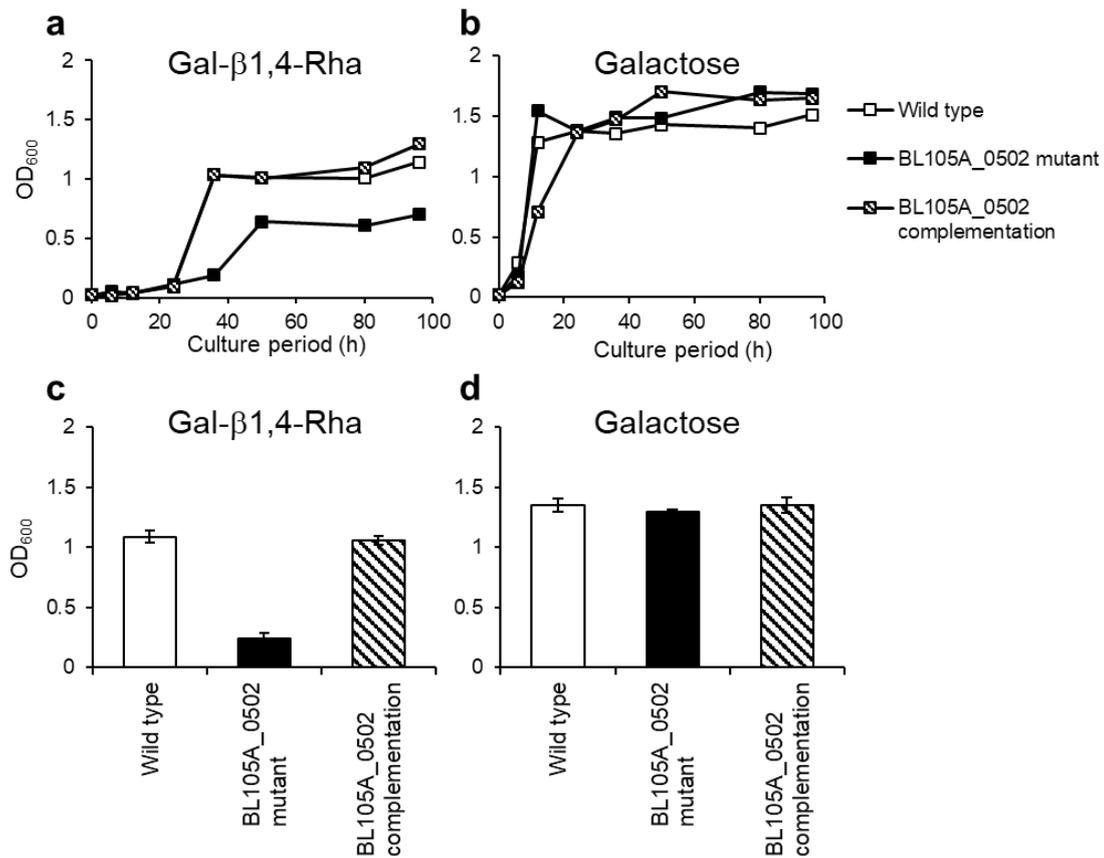


Figure 3-4 *B. longum* 105-A による Gal-β1,4-Rha 利用における BL105A_0502 遺伝子の重要性

(a-b) 単一炭素源として 0.5% (w/v) Gal-β1,4-Rha (a) または 0.5% (w/v) ガラクトース (b) を含む mMRS-wos における *B. longum* 105-A 野生株、BL105A_0502 変異株、BL105A_0502 相補株の生育曲線 (n = 1)。白四角にて野生株、黒四角にて BL105A_0502 挿入変異株、斜線模様の四角にて相補株の生育度をそれぞれ示した。(c-d) 単一炭素源として 0.5% (w/v) Gal-β 1,4-Rha (c) または 0.5% (w/v) ガラクトース (d) を含む mMRS-wos における *B. longum* 野生株 (白)、BL105A_0502 変異株 (黒) および相補株 (斜線) の培養 36 時間後の生育度 (n = 3)。データは平均値±標準偏差で示した。

第四節 ヒトの腸内細菌が Gal- β 1,4-Rha を利用するためには、BL105A_0502 ホモログが必要である

B. longum 105-A 以外のビフィズス菌(35) (36)およびヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種(9)について、BL105A_0502 ホモログの保存性を BLAST(34)を用いて解析した。ヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種について、BL105A_0502 のホモログタンパク質を持つ可能性のある細菌は見られなかった (Figure 3-5)。一方、解析したすべてのビフィズス菌は、BL105A_0502 のホモログを保有している可能性が非常に高いことが明らかとなった (Figure 3-5)。したがって、Gal- β 1,4-Rha によるビフィズス菌特異的な生育促進は、BL105A_0502 とそのホモログによるものであることが考えられた。

Bifidobacteria from human intestinal tract		dominant species of human gut microbes		dominant species of human gut microbes	
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM 1217		1 <i>Bacteroides uniformis</i>		29 <i>Bacteroides</i> sp. D1	
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> JCM 1222		2 <i>Alistipes putredinis</i>		30 <i>Bacteroides</i> sp. D4	N/A
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 1192		3 <i>Parabacteroides merdae</i>		31 <i>Eubacterium ventriosum</i>	
<i>Bifidobacterium scardovii</i> JCM 12489		4 <i>Dorea longicatena</i>		32 <i>Bacteroides dorei</i>	
<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i> JCM 15439		5 <i>Ruminococcus bromii</i> L2-63		33 <i>Ruminococcus obeum</i> A2-162	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703		6 <i>Bacteroides caccae</i>		34 <i>Subdoligranulum variabile</i>	
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> JCM 1200		7 <i>Clostridium</i> sp SS2-1		35 <i>Bacteroides capillosus</i>	
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> JCM 1194		8 <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482		36 <i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9	
<i>Bifidobacterium angulatum</i> JCM 7096		9 <i>Eubacterium hallii</i>		37 <i>Clostridium leptum</i>	
<i>Bifidobacterium bifidum</i> LMG 13195		10 <i>Ruminococcus torques</i> L2-14		38 <i>Holdemania filiformis</i>	
<i>Bifidobacterium gallicum</i> LMG 11596		11 Unknown sp. SS3 4	N/A	39 <i>Bacteroides stercoris</i>	
<i>Bifidobacterium faecale</i>	N/A	12 <i>Ruminococcus</i> sp SR1 5		40 <i>Coprococcus eutactus</i>	
		13 <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> SL3 3		41 <i>Clostridium</i> sp. M62 1	
		14 <i>Ruminococcus lactaris</i>		42 <i>Bacteroides eggerthii</i>	
		15 <i>Collinsella aerofaciens</i>		43 <i>Butyrivibrio crossotus</i>	
		16 <i>Dorea formicigenerans</i>		44 <i>Bacteroides finegoldii</i>	
		17 <i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482		45 <i>Parabacteroides johnsonii</i>	
		18 <i>Roseburia intestinalis</i> M50 1		46 <i>Clostridium</i> sp. L2-50	
		19 <i>Bacteroides</i> sp.2_1_7		47 <i>Clostridium nexile</i>	
		20 <i>Eubacterium siraeum</i> 70 3		48 <i>Bacteroides pectinophilus</i>	
		21 <i>Parabacteroides distasonis</i> ATCC 8503		49 <i>Anaerotruncus colihominis</i>	
		22 <i>Bacteroides</i> sp. 9_1_42FAA		50 <i>Ruminococcus gnavus</i>	
		23 <i>Bacteroides ovatus</i>		51 <i>Bacteroides intestinalis</i>	
		24 <i>Bacteroides</i> sp.4_3_47FAA		52 <i>Bacteroides fragilis</i> 3_1_12	
		25 <i>Bacteroides</i> sp.2_2_4		53 <i>Clostridium asparagiforme</i>	
		26 <i>Eubacterium rectale</i> M104 1		54 <i>Enterococcus faecalis</i> TX0104	
		27 <i>Bacteroides xylanisolvens</i> XB1A		55 <i>Clostridium scindens</i>	
		28 <i>Coprococcus comes</i> SL7 1		56 <i>Blautia hansenii</i>	

500 bits<	
≤500 bits	

Figure 3-5 BL105A_0502 の保存性解析

ビフィズス菌とヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種における BL105A_0502 ホモログの有無。NCBI データベース (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) に登録されているゲノムに対し、Protein BLAST 解析を行った。Protein BLAST 解析によるスコアを各カラムの色で示した。(黒) 500 bit 以上、(白) 500 bit 以下。NCBI データベースにゲノム情報が存在しない場合は、N/A で示した。

第五節 *In vitro* において *B. infantis* は *C. difficile* の生育を抑制する

上述の結果より、Gal- β 1,4-Rha は、Gal- β 1,4-Rha を利用することのできない他の腸内細菌が共存している環境においても、単菌で培養した場合と同様、ビフィズス菌の生育を選択的に促進することが予想される。そこで、Gal- β 1,4-Rha を利用することのできる *B. infantis* (Figure 3-1f) と競争させることにより、Gal- β 1,4-Rha を利用することのできない腸内病原菌である *Clostridioides difficile* (Figure 3-1f) を抑制することを試みた。Gal- β 1,4-Rha 存在下において、*C. difficile* を単菌で培養した場合と比較し、*B. infantis* と *C. difficile* の共培養を行った場合には、48 時間培養後の *C. difficile* の生菌数は 1/1,850 と大幅に減少した (Figure 3-6a)。一方、Gal- β 1,4-Rha が存在しない条件下では、どの時点においても *C. difficile* の生菌数の減少は見られなかった (Figure 3-6c)。これらの結果 (Figure 3-6a、3-6c) より、*C. difficile* の生育を大幅に抑制するためには、*B. infantis* と Gal- β 1,4-Rha の両方の存在が必要であることが示唆された。*B. infantis* と *C. difficile* が共に利用可能であるグルコースの存在下で培養した場合には、48 時間培養後の *C. difficile* の生菌数は 1/4 程度までの減少にとどまり、*C. difficile* の弱い生育抑制効果がみられた (Figure 3-6e)。一方で、培地の種類に関わらず、共培養による *B. infantis* の生菌数の減少はみられなかった (Figure 3-6b、3-6d、3-6f)。

第六節 Gal- β 1,4-Rha 含有培地における *B. infantis* による *C. difficile* の生育抑制には、BL105A_0502 のホモログである BLIJ_2090 が必要である

B. infantis JCM 1222^T は、*B. longum* の BL105A_0502 とのアミノ酸一致度が 96% であるタンパク質 BLIJ_2090 を持つ。Gal- β 1,4-Rha 存在下での *B. infantis* による *C. difficile* の生育抑制に BLIJ_2090 が関与しているかどうかを調べることを目的として、*B. infantis* BLIJ_2090 挿入変異株と *C. difficile* とを共培養し、*C. difficile* の生菌数について *B. infantis* 野生株との共培養時と比較した。この結果、Gal- β 1,4-Rha の存在下であるにもかかわらず、*B. infantis* BLIJ_2090 変異株との共培養による *C. difficile* の強い生育阻害は起こらなかった (Figure 3-6g、3-6i)。なお *B. infantis* の生菌数は、共培養の影響を受けなかった (Figure 3-6h)。これらの結果から、*B. infantis* の推定 Gal- β 1,4-Rha 基質結合タンパク質である BLIJ_2090 が、Gal- β 1,4-Rha 存在下における *C. difficile* の増殖抑制に関与することが示された。

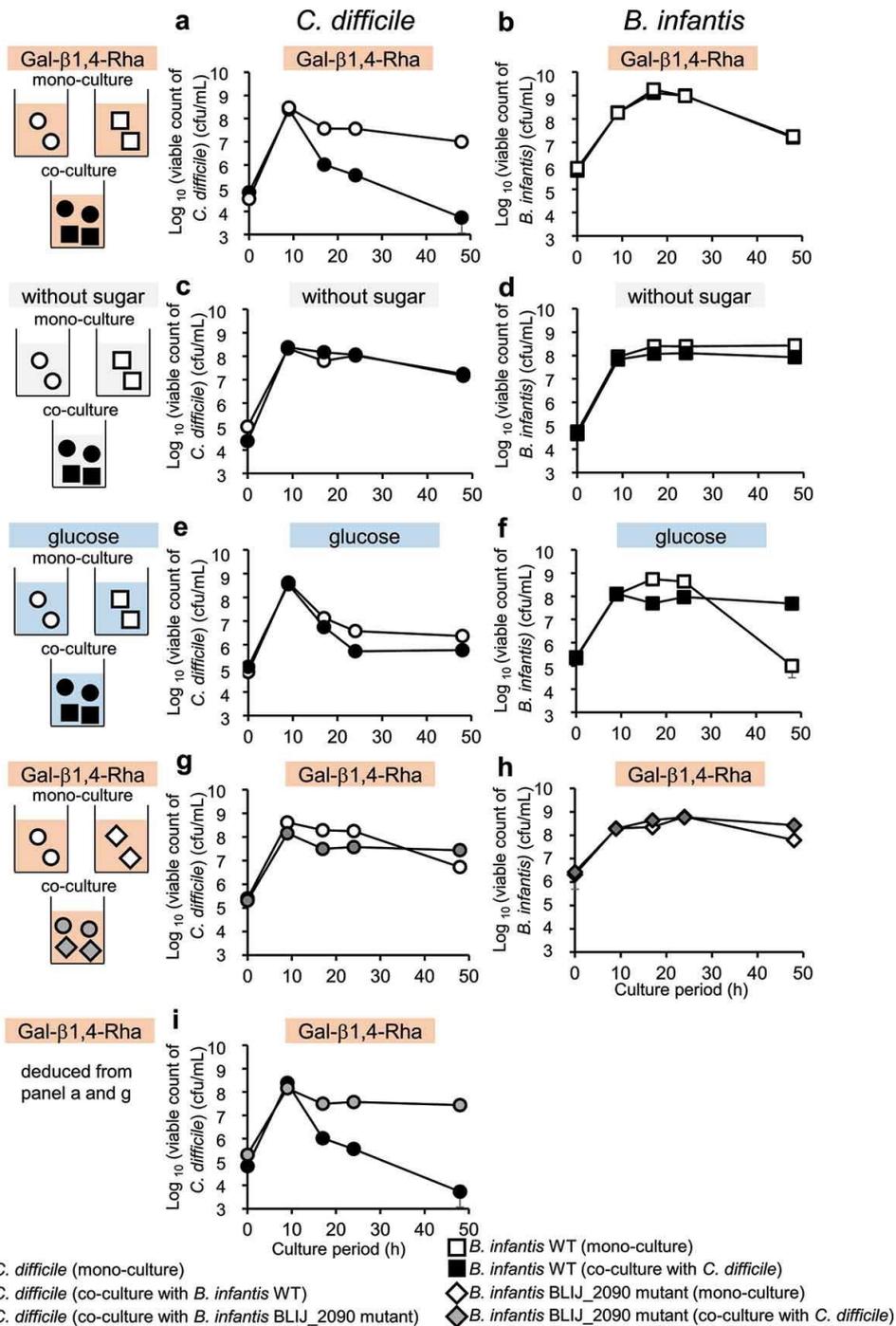


Figure 3-6 Gal- β 1,4-Rha 存在下における *B. infantis* による *C. difficile* の生育抑制と BLIJ_2090 遺伝子の重要性

(a, c, e, and g) *C. difficile* の生菌数を丸で示した。単菌培養時、*B. infantis* 野生株との共培養時、*B. infantis* BLIJ_2090 変異株との共培養時の生菌数をそれぞれ白、黒、灰色の記号で示した。(b, d, f, and h) *B. infantis* 野生株と BLIJ_2090 変異株の生菌数を、それぞれ白、黒、灰色の記号で示した。(a-b, g-i) GAM-wos に 0.5% (w/v) Gal- β 1,4-Rha を添加した。(e-f) GAM-wos に 0.5% (w/v) グルコースを添加した。(c-d) 糖質非添加 GAM-wos。i では、*B. infantis* 野生株との共培養時の *C. difficile* の生菌数と、*B. infantis* BLIJ_2090 変異株との共培養時の *C. difficile* の生菌数を比較した。データは平均値±標準偏差で示した (n = 3)。

第七節 Gal- β 1,4-Rha と *B. infantis* が *C. difficile* の毒素産生を阻害する

Gal- β 1,4-Rha を添加した培地でみられた *B. infantis* による *C. difficile* の生育抑制が、様々な腸内細菌が共存する条件下でも起こるかどうかを調べた。ヒト糞便懸濁液と Gal- β 1,4-Rha を添加した GAM-wos を用いて *B. infantis* と *C. difficile* を共培養し、*C. difficile* 毒素 (CD 毒素) を定量した (Figure 3-7、Figure 3-8a)。5 人のドナーの糞便懸濁液を用いて得られた結果について、統計解析を行った (Paired one-way ANOVA with Bonferroni correction)。試験に使用したすべての糞便懸濁液について、*C. difficile* を接種せずに培養した場合には、CD 毒素は検出されなかった (データは示していない)。糞便培養液に *C. difficile* を接種したところ、すべての培養液から CD 毒素が検出された (Figure 3-8a 黒色バー)。*C. difficile* を接種した糞便培養液に *B. infantis* を加えた場合では、CD 毒素の量は大きく減少しなかった (Figure 3-7 灰色バー)。*C. difficile* と *B. infantis* を接種した糞便培養液に Gal- β 1,4-Rha を添加すると、CD 毒素の量が有意に減少した (Figure 3-7 格子模様バー)。糞便 A、C、D を用いた糞便培養では、CD 毒素量は 3 分の 1 以下に激減した (Figure 3-8a 格子模様バー)。*C. difficile* を接種した際に毒素量が少なかった B と E の糞便 (Figure 3-8a 黒色バー) を用いた培養液の CD 毒素量は、ほとんど減少しなかった (Figure 3-8a 格子模様バー)。以上のことから、個人差はあるものの、Gal- β 1,4-Rha は *B. infantis* の存在下で CD 毒素

の産生を有意に抑制した。*B. infantis* を接種しない場合には、CD 毒素の量は有意な減少を示さなかった (Figure 3-8a 斜線バー)。以上の結果から、CD 毒素の産生は、Gal- β 1,4-Rha と *B. infantis* が同時に存在するときに最も強く抑制されることが示された。しかしながら、糞便培養液中の *C. difficile* の細菌数には差がなかった (Figure 3-8b 格子模様バー)。

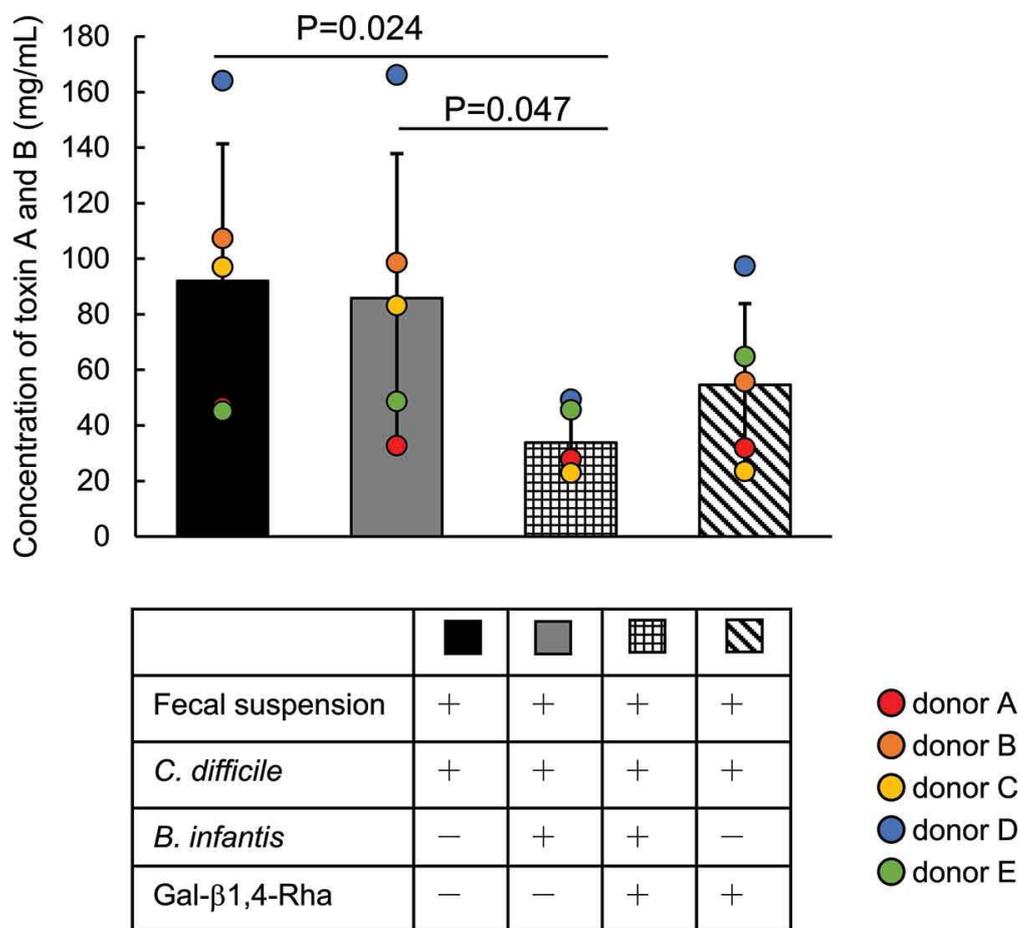
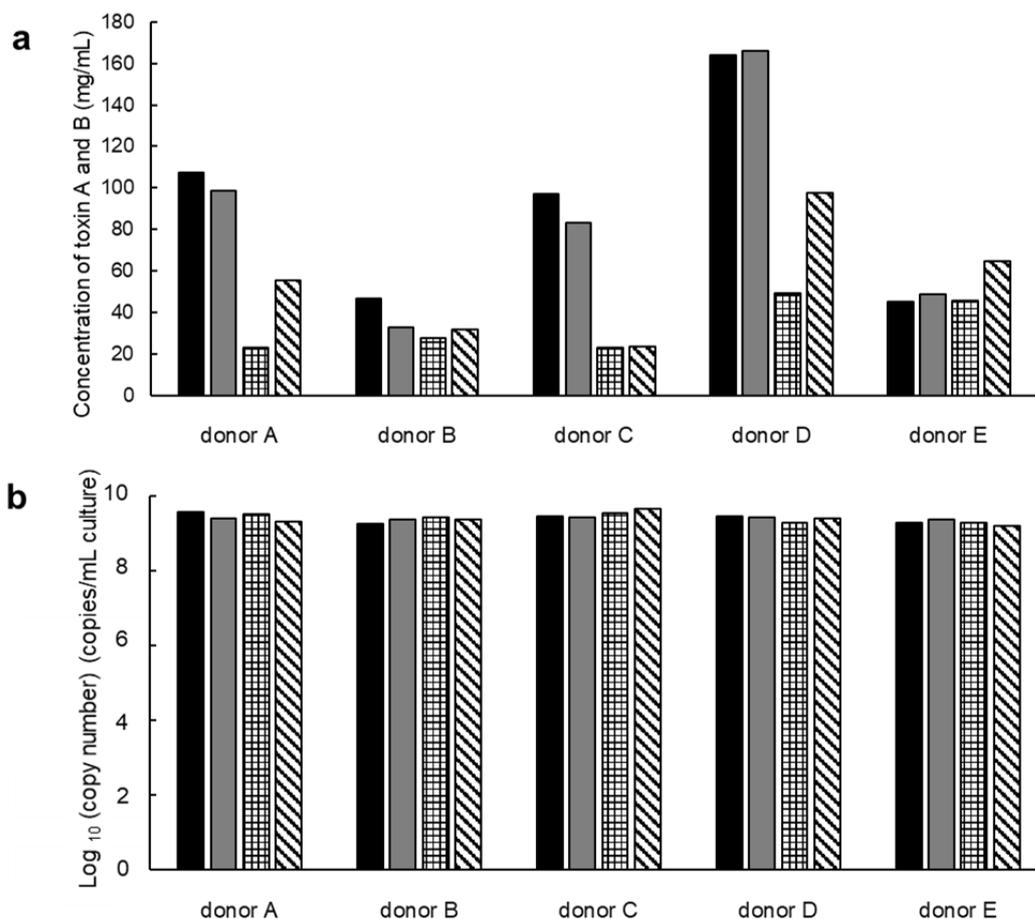


Figure 3-7 糞便培養における Gal-β1,4-Rha と *B. infantis* の併用によるディフィシル毒素産生抑制効果

C. difficile、*B. infantis* 及び 5 人のドナー由来のヒト糞便懸濁液を 0.5% (w/v) Gal-β1,4-Rha を添加した GAM-wos あるいは Gal-β1,4-Rha 非添加 GAM-wos に接種し、48 時間培養後の糞便培養液中の CD 毒素 A および B を ELISA で定量した。糞便懸濁液と *C. difficile* を GAM-wos で培養した場合を黒、糞便懸濁液、*C. difficile*、*B. infantis* を GAM-wos で培養した場合を灰色、糞便懸濁液、*C. difficile*、*B. infantis* を 0.5% (w/v) Gal-β1,4-Rha を添加した GAM-wos で培養した場合を格子模様、糞便懸濁液、*C. difficile* を 0.5% (w/v) Gal-β1,4-Rha を添加した GAM-wos で培養した場合を斜線模様のバーでそれぞれ示した。これらの培養条件を図の下の表にまとめた (+: 要素が培地に加えられた; -: 加えられていない)。すべての糞便懸濁液について、*C. difficile* を培養液に接種しなかった場合、CD 毒素は検出されなかった (データは図中に示していない)。データは平均値±標準偏差で示した (n=5)。P 値は、Paired one-way ANOVA followed by multiple comparison with Bonferroni correction による解析結果を示す。個々のデータポイントを円で示した。



	■	■	▣	▨
Fecal suspension	+	+	+	+
<i>C. difficile</i>	+	+	+	+
<i>B. infantis</i>	-	+	+	-
Gal-β1,4-Rha	-	-	+	+

Figure 3-8 糞便培養における Gal-β1,4-Rha と *B. infantis* の併用によるディフィシル毒素産生抑制効果

C. difficile、*B. infantis* 及び 5 人のドナー由来のヒト糞便懸濁液を 0.5% (w/v) で Gal-β1,4-Rha を添加した GAM-wos あるいは Gal-β1,4-Rha 非添加 GAM-wos に接種し、48 時間した。糞便懸濁液と *C. difficile* を GAM-wos で培養した場合を黒、糞便懸濁液、*C. difficile*、*B. infantis* を GAM-wos で培養した場合を灰色、糞便懸濁液、*C. difficile*、*B. infantis* を 0.5% (w/v) Gal-β1,4-Rha を添加した GAM-wos で培養した場合を格子模様、糞便懸濁液、*C. difficile* を 0.5% (w/v) Gal-β1,4-Rha を添加した GAM-wos で培養した場合を斜線模様のバーでそれぞれ示した。これらの培養条件を図の下表にまとめた (+: 要素が培地に加えられた; -: 加えられていない)。(a) 糞便培養液中の CD 毒素 A 及び B を ELISA で定量した。Figure 3-7 の個別データを示した。すべての糞便懸濁液について、*C. difficile* を培養液に接種しなかった場合、CD 毒素は検出されなかった (データは図中に示していない)。(b) 糞便培養液中の *C. difficile* 16S rRNA 遺伝子のコピー数を qPCR で定量した。*C. difficile* は 1 細胞あたり 16S rRNA 遺伝子を 12 コピー持っている。

第八節 *In vivo* における *C. difficile* の生育抑制試験

In vivo における *C. difficile* の増殖抑制効果を調べるために、*C. difficile*、*B. infantis*、Gal- β 1,4-Rha を様々な組み合わせで、抗生物質を投与したマウスに 5 日間投与し (Figure 3-9、Table 3-1)、体重の変化 (Figure 3-10、Figure 3-11) とともに、糞便中の *B. infantis* (Figure 3-12) と *C. difficile* (Figure 3-13) の細菌数を推定した。

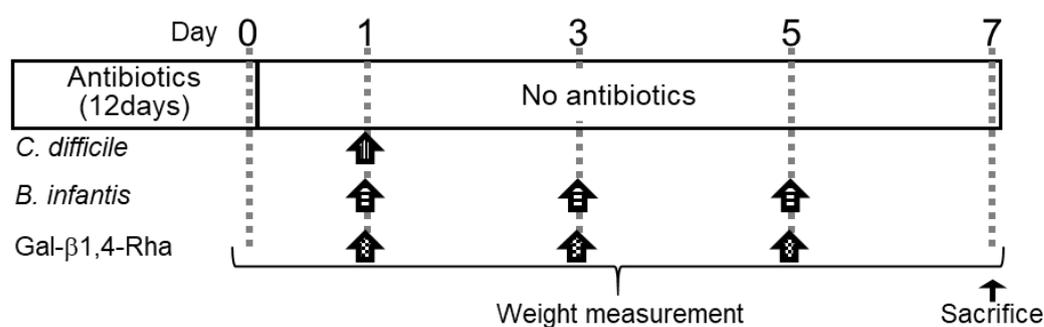


Figure 3-9 *C. difficile* 感染試験の概要

矢印で Gal- β 1,4-Rha あるいは細菌を投与した時点を示した。

Table 3-1 *C. difficile* 感染試験の投与群の概要

group	<i>C. difficile</i>	<i>B. infantis</i>	Gal- β 1,4-Rha	n
A	+	-	-	6
B	+	-	+	6
C	+	+	-	6
D	+	+	+	6
E	+	+ (BLIJ_2090 mutant)	+	7

(+, 投与; -, 非投与)

C. difficile の感染後、体重はすべての群で有意に減少し始めた (Figure 3-10)。

しかし、Gal-β1,4-Rha、*C. difficile*、および野生型 *B. infantis* を組み合わせて投与したマウスでは、1日目から5日目まで体重が有意に減少したが、5日目から7日目にかけて0日目のレベルまで回復した (Figure 3-10 の D 群)。Gal-β1,4-Rha および野生型 *B. infantis* の両方を投与した D 群では、初日と比較した時の *C. difficile* 感染に伴う7日目の体重の減少が全ての群の中で最も小さかった (Figure 3-11)。0日目と比較した7日目における体重変化率が Gal-β1,4-Rha および *B. infantis* の両方を投与していない A 群に比べて有意に小さかったのは D 群のみであった (Figure 3-11)。また、Gal-β1,4-Rha と野生型 *B. infantis* の両方を投与した D 群では、Gal-β1,4-Rha のみを投与した B 群、野生型 *B. infantis* のみを投与した C 群に比べて、有意に体重が回復した。一方、Gal-β1,4-Rha、*C. difficile*、*B. infantis* BLIJ_2090 変異株を組み合わせて投与したマウスでは、体重が減少し続けた (Figure 3-10 の E 群)。これは、*B. infantis* が本研究で同定したトランスポーターを介して Gal-β1,4-Rha を取り込み、*in vivo* における *C. difficile* 感染による体重減少を緩和していることを示唆している。また、Gal-β1,4-Rha と野生型 *B. infantis* を投与したマウスの糞便中の *B. infantis* の細菌数は、野生型 *B. infantis* を単独で投与した場合に比べて有意に多かった (Figure 3-12)。これらのことから、Gal-β1,4-Rha はマウスの腸管内腔で *B. infantis* の増殖

を促進している可能性が示唆された。しかし、マウスの糞便中の *C. difficile* の細菌数には差がなく、生体内における *C. difficile* の増殖抑制効果は認められなかった (Figure 3-13)。

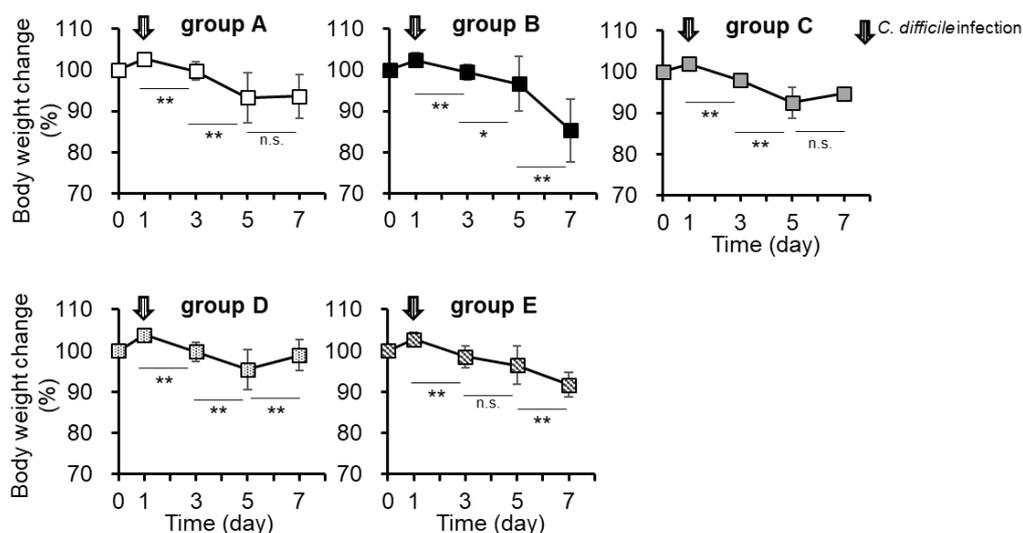


Figure 3-10 体重変化

Day0 の体重を 100 としたときの経日的な体重の変化。アスタリスクは、*C. difficile* 感染後の同一の群の前回測定値に対する統計的有意性を示す (* $p < .05$ 、** $p < .01$ 、two-way ANOVA with repeated measurement followed by Tukey multiple comparison test)。データは平均値±標準偏差で示した。

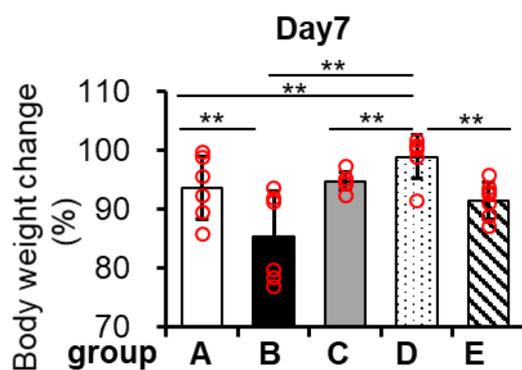


Figure 3-11 体重変化

Day0 の体重を 100 としたときの Day7 における体重の変化率。アスタリスクは、7 日目の A 群および D 群に対する統計的有意性を示す (* $p < .05$ 、** $p < .01$ 、two-way ANOVA with repeated measurement followed by Tukey multiple comparison test)。データは平均値±標準偏差で示した。

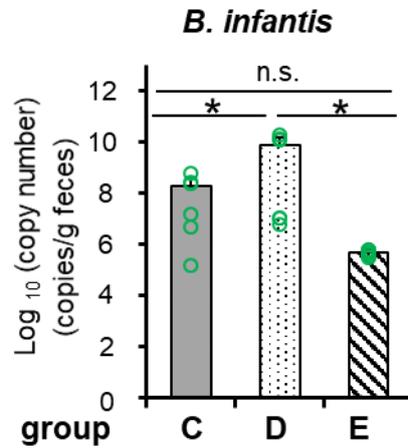


Figure 3-12 B. infantis の菌数の推定

Day 7 の糞便中の *B. infantis* のβ-ガラクトシダーゼ 42B 遺伝子のコピー数を qPCR によって定量した。*B. infantis* は 1 細胞あたり 1 コピーのβ-ガラクトシダーゼ 42B 遺伝子を保持している。アスタリスクは統計的有意性を示す (* $p < .05$, one-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison test)。データは平均値±標準偏差で示した。個々のデータポイントを円で示した。

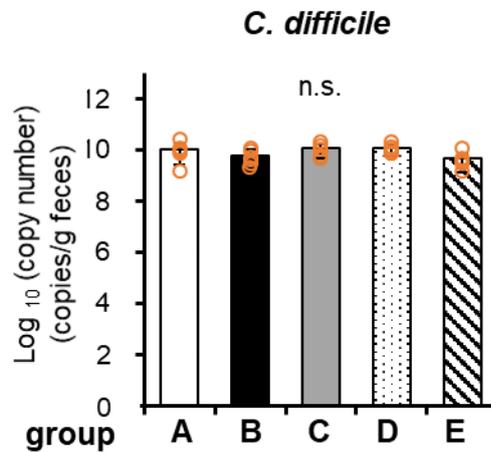


Figure 3-13 C. difficile の菌数の推定

Day 7 の糞便中の *C. difficile* の 16S rRNA 遺伝子のコピー数を qPCR によって定量した。*C. difficile* は 1 細胞あたり 12 コピーの 16S rRNA 遺伝子を保持している。統計的な有意差はみられなかった (* $p < .05$, one-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison test)。データは平均値±標準偏差で示した。個々のデータポイントを円で示した。

第四部 考察

本研究では、いくつかの既存のプレバイオティクスがヒトにとって有益な細菌だけでなく、*in vitro* において日和見菌の増殖を促進することが示されたため、ヒトの腸管内腔においても同様に機能不明の日和見菌の増殖を促進する可能性が考えられた。これらの日和見菌はヒトの腸管内で優勢であるが(9)、以前はヒトの健康に害を与えると考えられてこなかった。しかしながら、近年、日和見菌のなかにはヒト健康に悪影響を及ぼすものがあることが示唆されてきた(13, 14, 42)。本研究では、腸管内に存在する日和見菌や悪玉菌の増殖を促進せず、ビフィズス菌や乳酸菌の増殖を特異的に促進することのできる次世代型プレバイオティクスの開発を目指し、様々な β -ガラクトシドについてスクリーニングを行った。この結果、私たちのグループで開発したハイスループット培養システム(単一の培地を用いて約80種の細菌を一斉に培養するシステム)(29)を用いて、Gal- β 1,4-Rha を選び出すことに成功した。これまでに、ノトバイオトマウスを用いた実験で難消化性多糖類であるポルフィランの投与量を調整することにより、*Bacteroides ovatus* の存在量をコントロールすることに成功したという報告がある(43)。この報告では腸管内で競合する他の腸内細菌の存在については解析が行われていないが(43)、増殖促進効果について特異性を有する Gal- β 1,4-Rha においては、その投与量を調整することで目的とする善玉菌のみの菌数を自在に調節

することができ、プレバイオティクスの使用法に革命をもたらす可能性がある。

我々は、次世代型プレバイオティクス候補として、Gal- β 1,4-Rha をスクリーニングすることに成功した。ヘルスクレーム（「腸内環境を改善する」のような健康表示）の表示に関するガイドラインは国によって異なるが、ヒト介入試験が必要とされることがほとんどである。そこで、Gal- β 1,4-Rha がプレバイオティクスとしての承認を得て上市することを実現するためには、ヒトの腸内でビフィズス菌を増やすことが可能であることを実証することを目的としたヒト介入試験が必要である。

本研究では *B. longum* 105-A の遺伝子破壊株を用いて、Gal- β 1,4-Rha を利用するためには、ABC トランスポーターの基質結合タンパク質である BL105A_0502 が必要であることを直接的に証明した。BL105A_0502 のホモログは *Bifidobacterium* に特異的に見られることから、BL105A_0502 は Gal- β 1,4-Rha を介した *Bifidobacterium* の特異的な増殖促進メカニズムの鍵となる因子であると考えられる。また、BL105A_0502 は、プレバイオティクスであるラクチュロースの基質結合タンパク質であることが報告されている(22)。本研究では、Gal- β 1,4-Rha が BL105A_0502 および BLIJ_2090 にコードされるタンパク質のもう一つの基質であることを示した。したがって、BL105A_0502 は複数の基質をもっており、ビフィズス菌がラクチュロースや Gal- β 1,4-Rha といった様々な糖質を

利用するために必要なタンパク質であることが示唆された。

これまでに、*B. animalis* subsp. *lactis* B1-04 の基質結合タンパク質である BALAC_0483 が Gal- β 1,4-Rha (KD は示されていない(44)) とラクチュロース (KD : $(4.9 \pm 0.3) \times 10^{-4}$ M (44)) に結合することが報告されている(44)。しかしながら、BALAC_0483 と BL105A_0502 および BLIJ_2090 とのアミノ酸配列の一致度はそれぞれ 51.2%、48.1%であり、BALAC_0483 が BL105A_0502 のホモログであるかは定かではない。

Gal- β 1,4-Rha は、自然界ではペクチンのラムノガラクトツロナン I の構造の一部として存在しており(45)、タンジー (*Tanacetum vulgare* L.) に含まれていることが報告されている(46)。いくつかの研究において、ビフィズス菌が植物由来のオリゴ糖を栄養源として利用できることが明らかとされている(47, 48)。したがって、植物由来の食物繊維は、未消化の状態ですべて宿主である動物の大腸内に到達することが考えられる。ビフィズス菌は、BL105A_0502 ホモログを基質結合タンパク質とするような ABC トランスポーターを採用することで、Gal- β 1,4-Rha を構造として含む糖質を炭素源として利用できる能力を保持し、ニッチを占めている可能性も考えられる。また、注目すべきことに、Gal- β 1,4-Rha の構造が、*Bifidobacterium longum* JBL05 が産生する細胞外多糖に含まれているという報告がある(49)。腸内常在菌叢最優勢種である *Bacteroides thetaiotaomicron* が酵母の

細胞壁の糖鎖を分解している報告(50)があるように、腸内細菌は腸内で他の生物に由来する多糖を利用している可能性がある。ビフィズス菌同士が大腸内腔の隣接したニッチを共有していると仮定すると、そこに存在する Gal- β 1,4-Rha の絶対量は不明であるが、ビフィズス菌は、同属の細菌が産生した細胞外多糖に由来する Gal- β 1,4-Rha を利用している可能性も考えられる。

ビフィズス菌は、Gal- β 1,4-Rha を ABC トランスポーターを介して取りこんだ後、細胞内の酵素を用いて分解することが予想される。*B. infantis* は、3種類の GH42 β -ガラクトシダーゼ (Bga42A、Bga42B、Bga42C) を有しており、これらの β -ガラクトシダーゼはヒトのミルクオリゴ糖である Gal- β 1,3-Gal と Gal- β 1,3-Glc を加水分解することが報告されている(51, 52)。*B. infantis* のゲノム DNA 上において、GH42 β -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子である BLIJ_2092 は、Gal- β 1,4-Rha トランスポーターである BLIJ_2090 の近傍に位置している (Table 4-1、Figure 4-1)。また、L-Rha と D-Glc が持つ3つの水酸基の向きが似ていることから(20)、Gal- β 1,4-Rha、Gal- β 1,3-Gal および Gal- β 1,3-Glc の構造には類似性がある。そこで、GH42 β -ガラクトシダーゼが Gal- β 1,4-Rha 分解酵素の候補であることが考えられ、将来的にこの仮説を検証するための追加の研究が必要である。

Table 4-1 BLIJ_2090 周辺の遺伝子およびそれらの機能予測

遺伝子	予想される機能
BLIJ_2088	putative flavoprotein
BLIJ_2089	conserved hypothetical protein
BLIJ_2090	sugar ABC transporter substrate binding component
BLIJ_2091	hypothetical protein
BLIJ_2092	beta-galactosidase
BLIJ_2093	putative ribosomal pseudouridine synthase
BLIJ_2094	D-fructose-6-phosphate amidotransferase

B. infantis ATCC 15697 のゲノム情報 (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=T02092) で該当の locus tag を検索し、Name 欄の情報を特徴として示した。

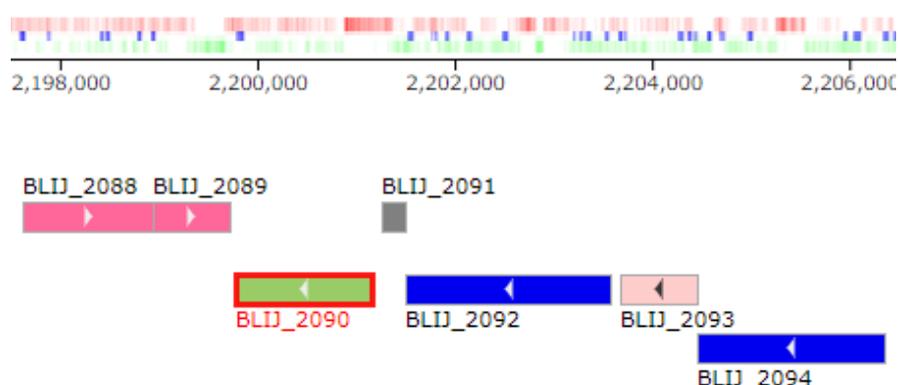


Figure 4-1 BLIJ_2090 の遺伝子クラスター周辺図

KEGG で BLIJ_2090 の遺伝子クラスター周辺図を検索し (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_genome?kid=blon:BLIJ_2090)、抜粋した。

本研究のマウスモデルでは、*B. infantis* と Gal-β1,4-Rha の両方を投与した D 群が、*C. difficile* による体重減少を最も強く緩和したことから、*B. infantis* と Gal-β1,4-Rha の同時投与が偽膜性腸炎の治療法として有望であることが示された。一方で、*C. difficile* に加えて Gal-β1,4-Rha を投与した B 群 (Figure3-11 黒色バー) では、最も大きな体重減少が見られた。同量の Gal-β1,4-Rha を単独で投与した

場合には下痢や体重減少はおこらなかった (データは示していない) が、*C. difficile* の感染によって損傷した腸壁に Gal-β1,4-Rha が流入したことで腸壁が浸透圧の変化に耐えられなくなったことで炎症を発生し、B 群の体重減少が大きくなった可能性がある。一方で、B 群と D 群の体重減少の回復には有意差があり (Figure 3-11)、この差はビフィズス菌が Gal-β1,4-Rha を資化したことによる効果によるものであると考えられる。また、*B. infantis* 野生株を投与した D 群では、BLIJ_2090 変異株を投与した E 群と比較して有意に体重減少の回復がみられたことから、ビフィズス菌による Gal-β1,4-Rha の利用能力がマウスの体重減少の抑制に関与していることが示唆された。

本研究は、Gal-β1,4-Rha の治療への応用に向けた研究の第一歩となる。投与量や投与方法を最適化することで、将来的には治療の選択肢の一つになることが期待される。この方法の有効性を示すためには、ヒトでの臨床試験が必要である。Gal-β1,4-Rha を天然物質から特異的に抽出することのできる酵素は現在のところ報告されていないことから、本研究では組み換え体酵素を用いた酵素合成により産生した Gal-β1,4-Rha を用いた。組み換え体酵素を用いた酵素合成品の安全性試験は天然物から抽出した成分の安全性試験よりもハードルが高いことから、今後、天然物質から Gal-β1,4-Rha を大量に生産する方法を開発することができれば、ヒト臨床試験の実施に一步近づくことができる。

これまで、偽膜性腸炎の治療にプロバイオティクスやシンバイオティクスが臨床的に使用されたことはなかった。本研究では、*in vitro* においてビフィズス菌と Gal- β 1,4-Rha の組み合わせが *C. difficile* の生育を抑制できること、また、*C. difficile* 腸炎マウスモデルにおいて、ビフィズス菌と Gal- β 1,4-Rha を組み合わせで投与することで、マウスの体重減少が緩和されることを示した。したがって、本研究の結果は、次世代プレバイオティクスとプロバイオティクス細菌の組み合わせによる偽膜性腸炎の新たな治療法の確立に向けた道のさきがけとなると考えられる。

参考文献

1. A. Almeida *et al.*, A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* **568**, 499-504 (2019).
2. R. Sender, S. Fuchs, R. Milo, Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell* **164**, 337-340 (2016).
3. A. Giongo *et al.*, Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *The Isme Journal* **5**, 82-91 (2011).
4. J. Qin *et al.*, A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55-60 (2012).
5. K. Ridaura Vanessa *et al.*, Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* **341**, 1241214 (2013).
6. C. W. Png *et al.*, Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment *in vitro* utilization of mucin by other bacteria. *American Journal of Gastroenterology* **105**, (2010).
7. T. Fujimoto *et al.*, Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **28**, 613-619 (2013).
8. N. Qin *et al.*, Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*

- 513, 59-64 (2014).
9. J. Qin *et al.*, A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65 (2010).
 10. G. R. Gibson *et al.*, Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **14**, 491-502 (2017).
 11. B. Mao *et al.*, Lactulose differently modulates the composition of luminal and mucosal microbiota in C57BL/6J mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 6240-6247 (2016).
 12. B. Mao *et al.*, *In vitro* fermentation of raffinose by the human gut bacteria. *Food and Function* **9**, 5824-5831 (2018).
 13. T. Vatanen *et al.*, Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. *Cell* **165**, 842-853 (2016).
 14. M. S. Desai *et al.*, A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell* **167**, 1339-1353 e1321 (2016).
 15. S. S. Magill *et al.*, Multistate point-prevalence survey of health care-associated

- infections. *The New England Journal of Medicine* **370**, 1198-1208 (2014).
16. L. C. McDonald *et al.*, Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases* **66**, e1-e48 (2018).
 17. N. Alang, C. R. Kelly, Weight gain after fecal microbiota transplantation. *Open forum infectious diseases* **2**, ofv004 (2015).
 18. Z. DeFilipp *et al.*, Drug-resistant *E. coli* bacteremia transmitted by fecal microbiota transplant. *The New England Journal of Medicine* **381**, 2043-2050 (2019).
 19. M. Nishimoto, M. Kitaoka, Practical preparation of Lacto-*N*-biose I, a candidate for the bifidus factor in human milk. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 2101-2104 (2007).
 20. M. Nakajima, M. Nishimoto, M. Kitaoka, Characterization of three β -galactoside phosphorylases from *Clostridium phytofermentans*: discovery of D-galactosyl- β 1->4-L-rhamnose phosphorylase. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 19220-19227 (2009).
 21. M. Nishimoto, M. Kitaoka, One-pot enzymatic production of β -D-

- galactopyranosyl-(1 → 3)-2-acetamido-2-deoxy-D-galactose (galacto-*N*-biose) from sucrose and 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose (*N*-acetylgalactosamine). *Carbohydrate Research* **344**, 2573-2576 (2009).
22. K. Yoshida *et al.*, *Bifidobacterium* response to lactulose ingestion in the gut relies on a solute-binding protein-dependent ABC transporter. *Communications Biology* **4**, 541 (2021).
23. T. Katoh *et al.*, Enzymatic adaptation of *Bifidobacterium bifidum* to host glycans, viewed from glycoside hydrolyases and carbohydrate-binding modules. *Microorganisms* **8**, 481 (2020).
24. M. O'Connell Motherway, M. Kinsella, G. F. Fitzgerald, D. van Sinderen, Transcriptional and functional characterization of genetic elements involved in galacto-oligosaccharide utilization by *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbial biotechnology* **6**, 67-79 (2013).
25. H. Sotoya *et al.*, Identification of genes involved in galactooligosaccharide utilization in *Bifidobacterium breve* strain YIT 4014^T. *Microbiology (Reading, England)* **163**, 1420-1428 (2017).
26. R. Suzuki *et al.*, Structural and thermodynamic analyses of solute-binding Protein from *Bifidobacterium longum* specific for core 1 disaccharide and lacto-*N*-biose

- I. *The Journal of biological chemistry* **283**, 13165-13173 (2008).
27. K. J. O'Connell *et al.*, Metabolism of four α -glycosidic linkage-containing oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 6280-6292 (2013).
28. J. C. De MAN, M. ROGOSA, M. E. Sharpe, A Medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* **23**, 130-135 (1960).
29. A. Gotoh *et al.*, Use of Gifu Anaerobic Medium for culturing 32 dominant species of human gut microbes and its evaluation based on short-chain fatty acids fermentation profiles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **81**, 1-9 (2017).
30. M. Sakanaka *et al.*, Evolutionary adaptation in fucosyllactose uptake systems supports bifidobacteria-infant symbiosis. *Science Advances* **5**, eaaw7696 (2019).
31. Y. Hirayama *et al.*, Development of a double-crossover markerless gene deletion system in *Bifidobacterium longum*: functional analysis of the α -galactosidase gene for raffinose assimilation. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 4984-4994 (2012).
32. Y. Kanesaki *et al.*, Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* 105-A, a strain with high transformation efficiency. *Genome Announcements* **2**,

- e01311-14 (2014).
33. S. Fukuda *et al.*, Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**, 543-547 (2011).
 34. C. Camacho *et al.*, BLAST+: architecture and applications. *Bmc Bioinformatics* **10**, 421 (2009).
 35. F. Bottacini, M. Ventura, D. van Sinderen, M. O'Connell Motherway, Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories* **13 Suppl 1**, S4 (2014).
 36. J. H. Choi, K. M. Lee, M. K. Lee, C. J. Cha, G. B. Kim, *Bifidobacterium faecale* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 3134-3139 (2014).
 37. A. N. Edwards, J. M. Suarez, S. M. McBride, Culturing and maintaining *Clostridium difficile* in an anaerobic environment. *Journal of Visualized Experiments* e50787 (2013).
 38. T. Rinttila, A. Kassinen, E. Malinen, L. Krogius, A. Palva, Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 1166-1177 (2004).

39. M. Nakajima, M. Nishimoto, M. Kitaoka, Practical preparation of D-galactosyl- β 1 \rightarrow 4-L-rhamnose employing the combined action of phosphorylases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**, 1652-1655 (2010).
40. H. Matsumura, A. Takeuchi, Y. Kano, Construction of *Escherichia coli*-*Bifidobacterium longum* shuttle vector transforming *B. longum* 105-A and 108-A. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **61**, 1211-1212 (1997).
41. S. Parche *et al.*, Sugar transport systems of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **12**, 9-19 (2007).
42. Y. Duan *et al.*, Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease. *Nature* **575**, 505-511 (2019).
43. E. S. Shepherd, W. C. DeLoache, K. M. Pruss, W. R. Whitaker, J. L. Sonnenburg, An exclusive metabolic niche enables strain engraftment in the gut microbiota. *Nature* **557**, 434-438 (2018).
44. M. C. Theilmann, F. Fredslund, B. Svensson, L. Lo Leggio, M. Abou Hachem, Substrate preference of an ABC importer corresponds to selective growth on β -(1,6)-galactosides in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 11701-11711 (2019).
45. H. A. Schols, R. Visser, A. Voragen, *Pectins and Pectinases*. (2009).

46. A. Y. Polle, R. G. Ovodova, A. S. Shashkov, Y. S. Ovodov, Some structural features of pectic polysaccharide from tansy, *Tanacetum vulgare* L. *Carbohydrate Polymers* **49**, 337-344 (2002).
47. F. Crociani, A. Alessandrini, M. M. Mucci, B. Biavati, Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *International Journal of Food Microbiology* **24**, 199-210 (1994).
48. M. Komeno, H. Hayamizu, K. Fujita, H. Ashida, Two novel α -L-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* belonging to glycoside hydrolase family 43 cooperatively degrade arabinan. *Applied and Environmental Microbiology* **85**, e02582-18 (2019).
49. M. Kohno *et al.*, Structural characterization of the extracellular polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* JBL05. *Carbohydrate Polymers* **77**, 351-357 (2009).
50. F. Cuskin *et al.*, Human gut bacteroidetes can utilize yeast mannan through a selfish mechanism. *Nature* **517**, 165-169 (2015).
51. E. Yoshida *et al.*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* uses two different β -galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. *Glycobiology* **22**, 361-368 (2012).

52. A. H. Viborg *et al.*, Distinct substrate specificities of three glycoside hydrolase family 42 β -galactosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. *Glycobiology* **24**, 208-216 (2014).

関連論文

R. Hirano *et al.*, Next-generation prebiotic promotes selective growth of bifidobacteria, suppressing *Clostridioides difficile*. *Gut Microbes* **13**, 1973835 (2021).

謝辞

終わりに臨み、御指導、御鞭撻を頂きました指導教員の南博道 准教授に深く感謝致します。本研究を行うにあたり、熱心な御指導、御助言を頂きました近畿大学 栗原新 准教授に心より御礼申し上げます。日々、親身になってご指導頂きました京都大学 阪中幹祥 准教授に深く御礼申し上げます。また、数々のご助言を頂きました京都大学 片山高嶺 教授に感謝致します。

また、本論文の審査過程において丁寧にご指導頂きました河井重幸 教授ならびに小柳喬 准教授に心より感謝致します。

本研究に必須の Gal- β 1,4-Rha を含む糖質を提供して頂きました国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所の西本完 上級研究員、新潟大学 農学部の北岡本光 教授ならびに中井博之 准教授、動物実験について多大なご指導を頂きました東京大学医科学研究所の吉見一人 講師、ビフィズス菌の遺伝子破壊系を譲渡して頂きました北海道大学大学院農学研究院の吹谷智 准教授ならびに横田篤 教授、ビフィズス菌定量用プライマーを譲渡して頂きました京都大学の後藤愛那 博士、*C. difficile* マウスモデル構築についてご指導頂きました金沢大学附属病院の飯田宗穂 助教、細菌の DNA 抽出法をご教授頂きました理化学研究所の大野博司 チームリーダーならびに加藤完博士に深く御礼申し上げます。

最後になりましたが、研究生活において大変お世話になりました応用微生物学研究室の皆様、旧腸内細菌共生機構学講座の皆様、近畿大学 生物理工学部 食品免疫学研究室の皆様に心より御礼申し上げます。