

乳児腸内フローラの形成に影響を与える ビフィズス菌の遺伝特性と定着意義

松木隆広

ヤクルト本社中央研究所基盤研究所

略歴：1970年 東京都国立市生まれ。1993年 東京工業大学理学部卒業、1995年 同大学院生命理学研究科修士課程修了。1995年 ヤクルト本社入社。1996～99年 東京大学農学生命科学研究科受託研究生（出向）。2005年 東京大学農学生命科学研究科にて学位取得（農学）。2008～10年 パスツール研究所博士研究員（出向）。2010年 ヤクルト中央研究所基礎研究一部共生微生物研究室室長、2015年～ 基盤研究所共生システム研究室室長。

受賞：2007年 日本細菌学会黒屋奨学賞「ヒト腸内フローラ構成菌の定量的PCR検出法の確立および菌属・菌種分布の解析」。

主な研究テーマ：腸内フローラの微生物生態学、細菌学、ゲノム微生物学

要約：

研究の背景：ヒトの腸管内には多種多様な細菌が在住し、複雑な微生物生態系（腸内フローラ）が形成されている。この腸内フローラは様々な生理活性を有し、それゆえに宿主の健康と密接な関係がある。乳児の腸内フローラは誕生直後に形成が始まり、短期間のうちにその構成は大きく変化する¹⁾。乳児の腸内フローラは成人とは異なること、出産様式や摂取ミルクの影響を受けること、個人差が大きいこと、ビフィズス菌が優勢菌種であることが以前より報告されている²⁻⁵⁾。また、近年乳児期の腸内フローラの形成は、乳児の健康だけではなく、成長後の宿主の生理にも影響していることが明らかになってきた⁶⁻⁸⁾。しかし、腸内フローラ形成の法則性や個人差の程度、腸内の代謝産物との関連性は、ほとんどわかっていない。本研究では、27名の乳児から提供された217の便サンプルの菌叢構成と代謝産物を測定し、腸内フローラの構成パターンと代謝産物の関連性を考察した。さらにビフィズス菌に注目し、その表現型と遺伝的特性を調べ、乳児と腸内フローラ構成菌の関連性について考察した。

乳児腸内フローラ形成の法則性：誕生後1か月間の乳児腸内フローラの形成過程の法則性と個人差の程度を調べるため、12名の乳児から提供された202サンプルの16S rRNA 遺伝子のV1-V2領域の配列を調べた。その結果、生後1か月間の乳児の腸内菌叢は、Staphylococcaceae、Enterobacteriaceae、Bifidobacteriaceaeのいずれかが最優勢であることを特徴とする3つの群にクラスター分けできること、徐々にBifidobacteriaceae優勢の菌叢に移行すること、その移行時期は

乳児により異なることを見出した⁹⁾。これは、乳児の腸内環境に最も適応した菌群は Bifidobacteriaceae であり、Enterobacteriaceae、Staphylococcaceae がそれに続くことを示唆するものと考えられた。

腸内フローラ構成と腸内代謝産物の関連性：引き続き、27名の生後1か月目の便サンプルについて、その菌叢構成と有機酸濃度と pH を測定し、相互の関連性を調べたところ、ビフィズス菌が定着した乳児では、腸管内容物の有機酸濃度の上昇とそれに伴う pH の低下、および残存の母乳オリゴ糖の減少が観察された。これはビフィズス菌の定着によって、乳児腸内に存在する母乳オリゴ糖が利用されるようになり、その結果、酢酸が産生されて pH が低下しているためであるとの仮説を立てた。しかし、一部の乳児ではビフィズス菌が定着しているにもかかわらず、便中の母乳オリゴ糖の濃度が高いことが分かった。そこで、乳児便から29株のビフィズス菌を分離してその表現型を調べたところ、菌株間で母乳中に含まれるオリゴ糖（HMO）の主成分、フコシルラクトース（FL）に違いがあることが分かった。

乳児ビフィズス菌の HMO 利用機構の解明：乳児ビフィズス菌の FL 利用性が菌株間で異なる理由を明らかにするため、乳児便から分離されたビフィズス菌29株のドラフトゲノム解析を行った。次にフコシルラクトースをフコースとラクトースに分解するフコシダーゼの有無を確認したところ、すべての FL 利用株はフコシダーゼ遺伝子を持っていることが確認されたが、FL 非利用株の一部もこの遺伝子を持っていることがわかった。そこで、更に各菌株がもつ遺伝子を詳細に解析したところ、基質未同定の ABC 輸送体が FL を利用できる菌株にのみ存在することがわかった。この ABC 輸送体遺伝子を相同組換えにより欠損させたビフィズス菌株を作製したところ、FL を利用できなくなり、この ABC 輸送体が FL 利用の中心的な働きを担っていることが確認された。

FL を効率よく利用できるビフィズス菌は腸内環境に影響を与える：乳児から分離されるビフィズス菌の間に FL 利用性の違いが観察されたことから、生後1か月の乳児27名を FL 利用ビフィズス菌が優勢の乳児と FL 非利用ビフィズス菌が優勢の乳児、大腸菌群が優勢の乳児に群分けして、腸内フローラ構成と腸内環境を比較した。その結果、FL 利用ビフィズス菌が定着した乳児では、他の2群に比べて Bifidobacteriaceae の占有率が高く大腸菌群の占有率が低いこと、および腸内の酢酸濃度が高く、pH と残存の母乳オリゴ糖濃度が低いことが確認された。

結語：HMOの利用性はビフィズス菌の菌株間で異なること、HMOの主成分のFL利用には、新規のABC輸送体が重要な役割を果たしていること、このABC輸送体は、乳児の腸内の酢酸濃度とpHを規定する重要な因子であることを示すことができた。FL利用ビフィズス菌の定着による腸内環境の変化は、宿主にとって有益であることが数多く報告されていることから^{10, 11)}、今後乳児の腸内フローラを標的とした疾病予防法やプロバイオティクスの開発において、ビフィズス菌のこのような特性を考慮する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Mitsuoka, T. : Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci Microbiota Food Health* 33 : 99-116, 2014.
- 2) Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. & Brown, P. O. : Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5 : e177, 2007.
- 3) Tsuji, H. et al. : Molecular monitoring of the development of intestinal microbiota in Japanese infants. *Benef Microbes* 3 : 113-25, 2012.
- 4) Dogra, S. et al. : Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *MBio* 6 : e02419-e02414, 2015.
- 5) Backhed, F. et al. : The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 : 15718-23, 2004.
- 6) Heijtz, R. D. et al. : Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 : 3047-52, 2011.
- 7) Cox, L. M. et al. : Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 158 : 705-21, 2014.
- 8) Kostic, A. D. et al. : The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe* 17 : 260-73, 2015.
- 9) Matsuki, T. et al. : A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. *Nat Commun* 7 : 11939, 2016.
- 10) Fukuda, S. et al. : Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469 : 543-7, 2011.
- 11) Samuel, B. S. et al. : Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 : 16767-72, 2008.

Key genetic factors of bifidobacteria that affect infant gut microbiota development

Takahiro Matsuki

Yakult Central Institute, Basic Research Department

Brief curriculum vitae : Born in Tokyo, 1970. Graduated from Faculty of Science, Tokyo Institute of Technology in 1992. Completed master's course at Tokyo Institute of Technology in 1995. 1995 to Present, Yakult Central Institute. Visiting Scientist at the University of Tokyo from 1996 to 1999. PhD at the University of Tokyo in 2005. Visiting Scientist at Institute Pasteur from 2008 to 2010.

Prize : Kuroya Prize awarded by Japanese Society for Bacteriology.

Major field studies : Molecular ecology of human gut microbiota, Bacteriology, Genome microbiology.

Abstract :

Background : It is becoming increasingly apparent that the bacterial ecosystem in our gut has a profound influence on human health and disease. Initial gut microbe colonization begins immediately after birth, and bacterial ecosystems develop within the first few days¹⁾. Previous studies have reported that environmental factors including the mode of delivery and feeding affect the gut microbiota assemblage and that the process is not random²⁻⁵⁾. Furthermore, it has been indicated that the gut microbiota development during infancy can have long-lasting effects on the individual's future health⁶⁻⁸⁾. However, little is known about their pattern of progression, factors that drive the assembly of infant gut microbiota, and how these factors affect metabolite profiles. Here we investigated gut microbiota compositions and metabolic profiles for 217 stool samples obtained from 27 infants during their first month of life. The dynamics and equilibria of the development of microbiota were investigated, and their associations with metabolites were evaluated to identify key factors mediating symbiotic relationships between infants and the microbiota.

Early development of gut microbiota : To investigate the dynamics of gut microbiota immediately after birth, we analyzed the sequences of the V1-V2 region of the 16S rRNA genes of 202 samples obtained from 12 infants born by normal delivery. Overall, the composition of the infant's microbiota was rela-

tively simple, being predominated by either Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae, or Bifidobacteriaceae. We also observed directional transitions to Bifidobacteriaceae-dominant microbiota, and individual variations in the pace of progression. The results suggest that the best-adapted bacterial family in the infant gut may be Bifidobacteriaceae, followed by Enterobacteriaceae and Staphylococcaceae.

Bacterial lineage and gut environments : We then investigated fecal metabolite profiles and assessed the correlation between the metabolite profiles and bacterial lineages. We found that increased Bifidobacteriaceae abundance positively correlated with organic acid concentrations and total bacterial counts but negatively correlated with pH. Therefore, we hypothesized that bifidobacteria consume the remaining oligosaccharides in the infant gut, causing elevated acetate and lactate concentrations and decreased pH. However, some infants showed high fecal oligosaccharide concentrations despite the presence of Bifidobacteriaceae. We therefore isolated 29 bifidobacterial strains, investigated the HMO utilizing phenotype, and found that there were considerable differences in the utilization of fucosyllactose (FL, the main component of HMO).

ABC transporter play essential role in FL utilization : To gain insight into how the strains showed differences in FL utilization, we determined the draft genomes of all 29 strains. OrthoMCL clustering analysis clarified that the presence of a substrate-binding protein (SBP) of ABC transporter system corresponded with the FL-utilization phenotype in most strains. We further developed the knock-out strain of the ABC transporter SBP by homologous recombination. We confirmed that FL was not utilized by the FL-SBP gene-knock-out strain, demonstrating that the FL-SBP is responsible for FL utilization.

HMO-utilizing bifidobacteria affect gut ecosystems : Having identified the differences in FL utilization among bifidobacteria, we subdivided the Bifidobacteriaceae-dominated microbiota into those dominated by FL-utilizing bifidobacteria, non-FL-utilizing bifidobacteria and Enterobacteriaceae. Furthermore, we compared the microbiota compositions and faecal metabolite profiles. We discovered that infant with FL-utilizing bifidobacteria-dominated microbiota showed significantly higher Bifidobacteriaceae and lower Enterobacteriaceae abundances, as well as higher acetate concentrations and lower pH and residual oligosaccharide

concentrations.

Conclusion : Given the importance of infant gut microbiota for the long-term health of the individual, the FL-utilizing properties of bifidobacteria and related molecular mechanisms may ultimately have implications in therapeutic approaches or preventive medicine. Changes in metabolite profiles and microbiota compositions caused by FL-utilizing bifidobacteria have been suggested to have a variety of beneficial effects on the host^{10, 11)}. Therefore, our findings suggest that the presence of FL in breast milk and its utilization by bifidobacteria help fostering the mutually beneficial relationship between humans and the main constituents of the infant gut microbiota.

References

- 1) Mitsuoka, T. : Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci Microbiota Food Health* 33 : 99-116, 2014.
- 2) Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. & Brown, P. O. : Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5 : e177, 2007.
- 3) Tsuji, H. et al. : Molecular monitoring of the development of intestinal microbiota in Japanese infants. *Benef Microbes* 3 : 113-25, 2012.
- 4) Dogra, S. et al. : Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *MBio* 6 : e02419-e02414, 2015.
- 5) Backhed, F. et al. : The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 : 15718-23, 2004.
- 6) Heijtz, R. D. et al. : Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 : 3047-52, 2011.
- 7) Cox, L. M. et al. : Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 158 : 705-21, 2014.
- 8) Kostic, A. D. et al. : The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe* 17 : 260-73, 2015.
- 9) Matsuki, T. et al. : A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. *Nat Commun* 7 : 11939, 2016.
- 10) Fukuda, S. et al. : Bifidobacteria can protect from enteropathogenic

infection through production of acetate. *Nature* 469 : 543-7, 2011.

- 11) Samuel, B. S. et al. : Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 : 16767-72, 2008.