

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

2023年 4月 11日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 生命科学研究所

職 名 助教

氏 名 加藤 紀彦

助 成 の 種 類	令和4年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	硫酸化ムチン糖鎖末端構造が仲介するヒトと腸内細菌共生メカニズムの解明			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) なし			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 日本応用糖質科学会第48回近畿支部会1件、日本農芸化学会2023年度大会1件 Katoh T, and Ashida H, 2023, Methods Mol. Biol. (submitted); Takada H, et al, 2023 Methods Mol. Biol. (submitted).			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、 添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品費	828,901	
		通信費(海外送料)	127,558	
		雑役務費(英文校閲)	32,541	
学会会費	11,000			
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 科研費不採択のところ本研究活動推進助成費によって研究を進めることができ大変助かりました。今後も本 事業を継続していただきたいと存じます。			

## 成果の概要/加藤 紀彦

研究課題名：硫酸化ムチン糖鎖末端構造が仲介するヒトと腸内細菌共生メカニズムの解明

### <研究内容>

ヒト腸内常在性ビフィズス菌である *Bifidobacterium bifidum* は、ムチン糖鎖分解性糖質加水分解酵素 (glycoside hydrolase: GH) を細胞壁表層に発現する。腸管内での GH によるムチン糖鎖の分解は、腸内細菌叢多様性の維持や下流糖代謝物の宿主粘膜恒常性への関与が推定され、ヒト健康との関連が注目されている。本研究では、未解析 GH であった GH136 酵素に着目し、その硫酸化ムチン糖鎖の分解への関与と分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。前年度までに、GH136 組み換え酵素の発現と酵素学的解析に成功していたため、本助成を受けて今年度は欠損株の作製とそれらを用いた機能評価、酵素タンパク質の新規糖鎖結合ドメイン解析などを実施した。

### <研究成果>

該当酵素遺伝子および類似の酵素活性を示す GH20 酵素遺伝子に関して、それぞれ相同組み換え法を用いて単独、または二重の *B. bifidum* 欠損株を作製した。続いてそれぞれの遺伝子欠損株を用いてヒト糞便より抽出したムチンを炭素源として培養し、培養上清に遊離した糖に関して LC-MS/MS 分析法を用いて経時的に測定した。その結果、GH136 遺伝子は lacto-N-biose I (LNB) および硫酸化 LNB を遊離に関与し、一方の GH20 遺伝子は LNB の遊離のみに関与することを明らかにした。

さらに、GH136 酵素の機能未知のドメインについて Alphafold2 を用いて立体構造モデル推定を行ったところ、既知 carbohydrate-binding module (CBM) と低いながらも構造類似性を呈したため、糖との結合性が示唆された。実際に、本ドメイン組み換え酵素の糖鎖アレイ解析の結果、LacNAc 構造との結合性を示すことが明らかとなった。さらに ELISA によってもムチン糖鎖との結合性が示され、本ドメインはムチン糖鎖中の LacNAc 構造を認識する新規 CBM である可能性が示された。

### <今後の見通し>

本研究によって、ヒトムチン糖鎖への本酵素の作用が示されたが、データ再現性の確認など、より詳細な解析を引き続き行う必要がある。また CBM ドメインの結合評価に関しては、立体構造解析や表面プラズモン共鳴による解析など、別アプローチによるデータ収集も論文文化のためにも必要であるので継続して研究を実施していく予定である。