

平成 28 年 6 月 28 日

文部科学記者会御中
科学記者会御中

ヤクルト本社
東京工業大学
帝京大学

共同研究成果の発表について

一乳児期においてビフィズス菌が優勢になる腸内フローラ形成機構を解明ー

ヤクルト本社、東京工業大学、帝京大学は乳児期においてビフィズス菌が優勢になる腸内フローラ（腸内細菌類）形成機構を共同で解明しましたのでお知らせいたします。

その要点は以下の通りです。

- ビフィズス菌は、乳児期の腸内フローラにおいて優勢になることが知られていましたがメカニズムは分かっていませんでした。
- 本研究では、生後 1 か月の間に乳児の腸内フローラが大きく変化し、腸内細菌科およびスタフィロコッカス科に属する細菌群が優勢のフローラ構成から、ビフィズス菌が優勢のフローラ構成に変動することを明らかにしました。
- ビフィズス菌が優勢になるためには、母乳に含まれるオリゴ糖の主要構成成分「フコシルラクトース」が重要な役割を果たしていることをゲノム解析により解明しました。

本研究はヤクルト本社中央研究所の松木隆広室長、矢矧加奈副指導研究員、松本星隆副指導研究員、東京工業大学生命理工学院の森宙史助教、山本和也修士、山田拓司准教授、黒川顕特任教授（兼国立遺伝学研究所教授）、帝京大学医学部の児玉浩子博士らの共同グループで行われ、研究成果は 6 月 24 日発行の英科学誌「ネイチャーコミュニケーションズ（Nature Communications）」に掲載されました。

添付：ヤクルト本社発プレスリリース

【問い合わせ先】

- ・ヤクルト本社 広報室（担当：入口、村山、丸山）

TEL: 03-3574-8920

- ・東京工業大学 広報センター

Email: media@jim.titech.ac.jp

TEL: 03-5734-2975

- ・帝京大学 本部広報課

Email: kouhou@teikyo-u.ac.jp

TEL: 03-3964-4162

乳児ビフィズス菌の共生機構を分子レベルで解明

株式会社ヤクルト本社（社長 根岸 孝成）では、乳児期のビフィズス菌優勢の腸内フローラ形成には、ビフィズス菌の母乳オリゴ糖の主成分であるフコシルラクトース（FL）の利用性が重要であることを明らかにするとともに、その共生機構を分子レベルで解明しました。

なお本研究は、東京工業大学生命理工学院の黒川 顕特任教授（現 国立遺伝学研究所 ゲノム進化研究室教授）ならびに帝京大学医学部小児科学講座の児玉 浩子非常勤講師（前客員教授・現帝京平成大学 健康メディカル学部 健康栄養学科 学科長）との共同研究として実施しました。

本研究では、（１）FL を利用できるビフィズス菌が定着した乳児は、FL を利用できないビフィズス菌が定着している乳児に比べて、便中のビフィズス菌の占有率や酢酸濃度が高く、大腸菌群（Enterobacteriaceae）の占有率や pH が低いこと、（２）ビフィズス菌の FL の利用には菌体内に FL を取り込む FL 輸送体が重要であること、を見出しました。

FL 利用ビフィズス菌の定着によってもたらされる上述の腸内環境の変化は、感染症予防や個体の成長後の生理機能への影響など、宿主に対する有益な作用が多く報告されています。すなわち、母乳中に含まれる FL の存在と一部のビフィズス菌が有する FL 輸送体は、乳児とビフィズス菌が共生関係を構築するための重要な因子であると考えられます。

当社では、世界初のビフィズス菌の直接培養によるはっ酵乳「ミルミル」の発売や、腸内のビフィズス菌を特異的に増殖させるガラクトオリゴ糖の販売を通じて、ヒトの健康と腸内フローラの関連性に着目してきました。

本研究により、乳児の腸内ビフィズス菌の定着機構が明らかとなり、今後、乳児の腸内フローラを標的とした疾病の予防法や新たなプロバイオティクスの開発につながるものと期待されます。

本研究成果は学術誌「Nature Communications」に6月24日に公開されました。

1. 背景

最近の研究により、乳児期の腸内フローラ構成が成長後の個体の生理機能に大きな影響を及ぼすことが明らかとなっています。また、これまでの多くの研究から、乳児ではビフィズス菌優勢の腸内フローラ（ビフィズス・フローラ）が形成されることは明らかになっていますが、乳児期の腸内フローラ形成の法則性やビフィズス・フローラの形成機構は十分に明らかとはなっていませんでした。

そこで、乳児から生後1か月間に提供された糞便サンプルのフローラ構成を調べ、その動的変化と平衡、ならびに代謝産物との関係性を調べることにより、ビフィズス・フローラの形成に影響を及ぼす環境要因とビフィズス菌の特性について解析を行いました。

2. 研究内容

(1) 乳児期の腸内フローラ構成

通常分娩で生まれた12名の母乳により保育される新生児より、生後1か月間糞便を採取し、乳児期の腸内フローラ形成過程を解析しました (図1-a)。

その結果、生後1か月間の腸内フローラは、*Bifidobacteriaceae*、*Enterobacteriaceae*、または *Staphylococcaceae*が優勢の3つのグループに分類できることが、主成分解析によりわかりました (図1-b, c)。また、各グループ間の変遷には法則性があり、*Staphylococcaceae*が優勢のグループから *Enterobacteriaceae*が優勢のグループへ、*Enterobacteriaceae*が優勢のグループから *Bifidobacteriaceae*が優勢のグループへ不可逆的に変化することがわかりました (図1-d)。

(2) 生後1か月目の腸内フローラ構成

上述の12名の新生児に加え、通常分娩で生まれた15名の母乳により保育される新生児より糞便の採集を行い(計27名)、生後1か月目の腸内フローラ構成を調べました。さらにこれら新生児の保護者(成人)22名より糞便の採集を行い、腸内フローラ構成を調べました。

その結果、生後1か月目の腸内フローラ構成は、*Bifidobacteriaceae*が優勢のグループと *Enterobacteriaceae*が優勢の2つのグループに分類できることがわかりました。一方、成人の腸内フローラ構成は、*Lachnospiraceae*、*Clostridiales incertae sedis XIV*、*Bacteroidaceae*、*Ruminococcaceae*および *Peptostreptococcaceae*優勢のグループのみでした(図2-a, b, c)。

(3) 腸内フローラ構成と腸内環境

腸内細菌の定着が腸内環境に及ぼす影響を調べるために、乳児糞便中のpHならびに有機酸の測定を行い、腸内フローラ構成との関係を調べたところ、*Bifidobacteriaceae*の占有率は、糞便の有機酸濃度と正に相関すること、ならびに糞便pHと負に相関することがわかりました (図3-a)。

これまでの研究で、ビフィズス菌は母乳オリゴ糖 (Human Milk Oligosaccharide, HMO) を利用することにより、その代謝産物として酢酸や乳酸を産生させることが報告されていることから、乳児糞便中の残存HMO量の測定を行いました。

その結果、糞便中のHMOの減少と糞便*Bifidobacteriaceae*占有率の増加、有機酸濃度の増加、pHの低下との間には相関関係が見られました (図3-b)。しかし、一部の乳児では、*Bifidobacteriaceae*が存在するにも関わらず、糞便中に高濃度のHMOが残存していることが明らかになりました (図3-c)。そこで、ビフィズス菌のHMOの利用能を調べるために、糞便よりビフィズス菌29株を分離し、HMOを唯一の炭素源とする培地を用いてビフィズス菌の増殖性、ならびにHMOの利用性を調べました。

その結果、図3-d, eに示したとおり、29菌株中14菌株はHMO添加培地で生育しましたが、15菌株は生育できませんでした。培地中の残存オリゴ糖を調べた結果、HMOの主要な構成成分であるFLの利用性は単離したビフィズス菌株により顕著な差があることがわかりました。

(4) ビフィズス菌のゲノムとFL利用性

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に、ビフィズス菌29株のゲノム解析を行いました (表1)。各菌株がもつ遺伝子を詳細に解析したところ、新たに見出された

ABC輸送体（FL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りました（図4-a）。

さらに、このABC輸送体遺伝子がFL利用性に関わっていることを証明するために、FL輸送体を欠損させたビフィズス菌株を作製し、HMOを含んだ培地での増殖性とFLの消費を調べたところ、FL輸送体欠損ビフィズス菌では増殖が抑制されること、FLが利用されなくなることが確認されました（図4-b、c）。

このことから、今回新たに見いだされたFL輸送体がHMOの主要構成成分であるFL利用の中心的な働きを担っていることがわかりました。

（5）FL利用能を有するビフィズス菌による腸内環境への作用

27名の乳児を、FL輸送用のFL輸送体を保有するFL利用ビフィズス菌株が優勢な乳児、FL非利用ビフィズス菌株が優勢な乳児、ならびにEnterobacteriaceaeが優勢な乳児に群分けし、糞便有機酸、pH、残存HMO量、腸内フローラの比較を行いました（図5）。

その結果、FL利用能を保有するビフィズス菌株が最優勢な乳児の糞便では、他の群の乳児に比べ、糞便中のBifidobacteriaceae占有率が高く、Enterobacteriaceae占有率が低いことが明らかになりました。また、FL利用能を保有するビフィズス菌株が定着した乳児の糞便では、残存のFL濃度が低いこと、酢酸濃度が高くpHが低値を示すことがわかりました。

3. 考察および今後の期待

前述したように、乳児期の腸内フローラ構成が成長後の個体の生理機能に大きな影響を及ぼすことが報告されています。これまでの研究から、多くの乳児の腸管内では、ビフィズス菌が最優勢菌となるビフィズス・フローラが形成されることが明らかになっています。これまでに、HMOの成分ラクト-N-テトラオースが、乳児の腸内でビフィズス菌に選択的に利用されることが明らかとなっていました¹。しかし、HMOの主成分FLのビフィズス菌の菌株間での利用性の違いやその機構は分かっていませんでした。また、乳児ごとに便中のビフィズス菌や大腸菌群（日和見感染菌）の占有率や有機酸濃度などが異なる理由をはじめビフィズス・フローラ形成に至る法則性は十分に明らかとはなっていませんでした。

本解析結果から、乳児期の腸内フローラは、Staphylococcaceae、Enterobacteriaceae、Bifidobacteriaceaeのいずれかが最優勢なフローラが形成されていること、ビフィズス菌優勢の腸内フローラ構成に不可逆的に変化すること、その移行時期は乳児によって異なることが確認されました。また、ビフィズス菌のHMO利用性が、糞便中のビフィズス菌の占有率と酢酸および残存オリゴ糖濃度、pH、大腸菌群占有率に大きな影響を及ぼしていることが明らかになりました。さらにHMOの主要な構成成分であるFLの利用にあたり、新たに見いだされたFL輸送体が重要な役割を果たしていることが分かりました。

新たに同定されたFL輸送体を保有するFL利用性ビフィズス菌株が定着した乳児では、FL利用性ビフィズス菌のHMO資化により、腸内のビフィズス菌占有率が上昇する結果、酢酸など有機酸生成が高まり、腸管内のpHが低下したと考えられます。これらの腸内環境の変化は、宿主によって有益な作用を及ぼすことが数多く報告されています^{2,3,4,5,6,7,8,9,10,11}。

したがって、本研究で見いだされたビフィズス菌が保有するFL輸送体は、乳児とビフィズス菌の共生関係を構築するための重要な因子であると考えられます。

これまで乳児期の腸内フローラの形成過程を解析した観察研究は数多く存在しますが、腸内フロ

ーラの形成機構に踏み込んだ研究はほとんどありませんでした。本研究は、ビフィズス菌の持つただ一つの遺伝子の有無によって、腸内のフローラ構成と腸内環境が影響を受けていることを、ヒトのコホートで示した最初の報告となります。

4. ヤクルト本社にとっての本研究の意義

ヤクルト本社中央研究所長の石川 文保は、「ヒトの腸内フローラの形成は出生直後から始まり、出生後数日で非常に多くの細菌が腸内に生息するようになります。これまでの新生児の腸内フローラ解析では、多くの新生児を用いた横断的な解析結果が報告されていましたが、特定の被験者を経時的かつ縦断的に解析した報告例、とりわけ有機酸など代謝物の解析、糞便中の残存糖の解析と腸内フローラの変化を組み合わせ考察した研究報告はありませんでした。当社はこれまでに、プレバイオティクス的一种であるガラクトオリゴ糖が殆どの乳児の腸内ビフィズス菌を増やすことを確認してきました。今回の研究により、乳児ではHMOが（選択的に）利用されることでビフィズス菌最優勢のフローラ構成となること、さらにその主成分であるFLの利用に関わる遺伝子とその重要性を明らかにすることができました。以上の事実から、乳児期にビフィズス菌やガラクトオリゴ糖を摂取することでビフィズス菌優勢のバランスのよい腸内フローラを構築できると考えることができます。今後さらに研究を発展させ、ビフィズス・フローラと健康のかかわりについて追究してまいります。」とコメントしています。

以 上

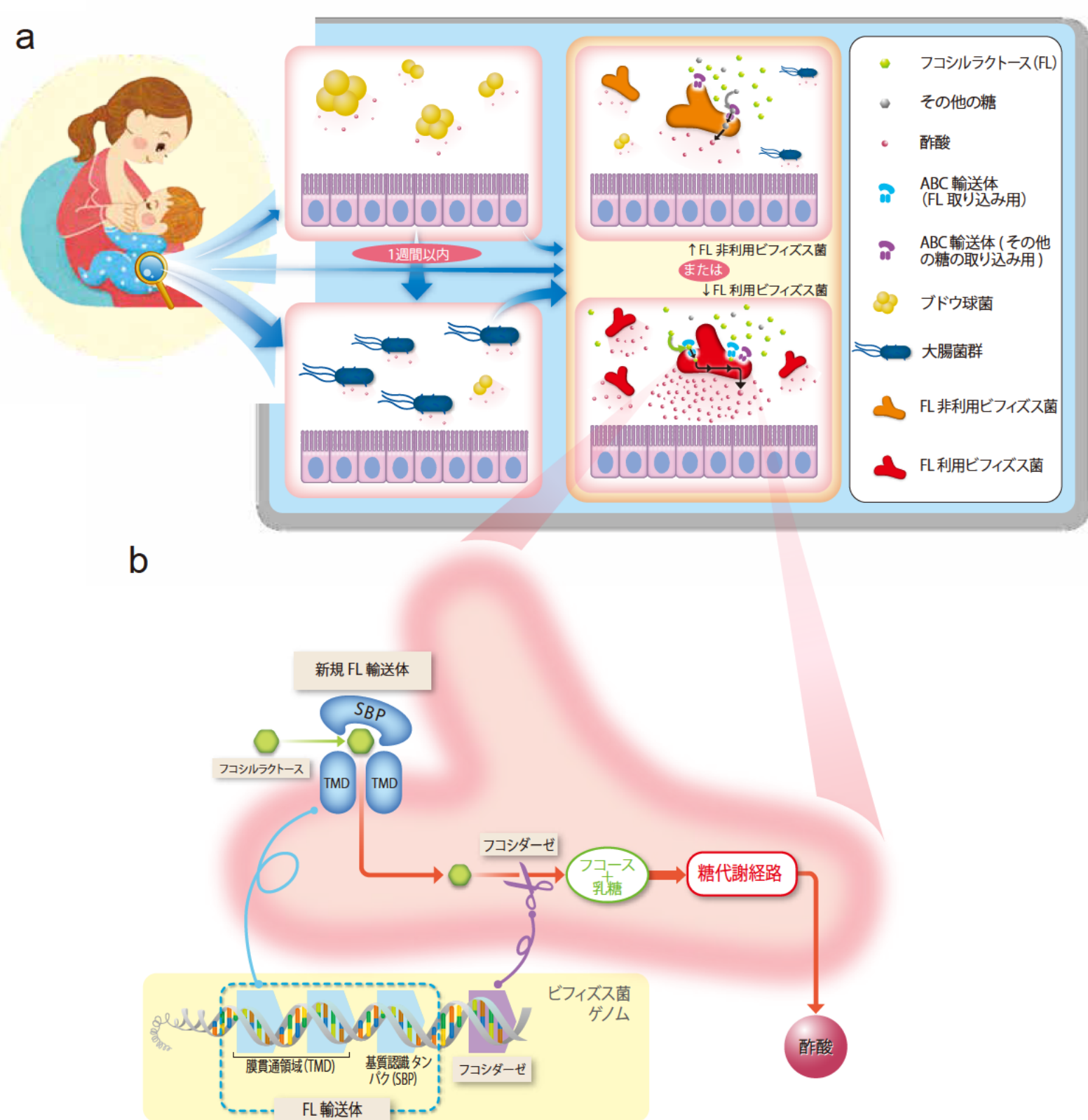
〔この件に関するお問い合わせ先〕

広報室（担当：入口、村山、丸山）

電話：03-3574-8920

参考文献

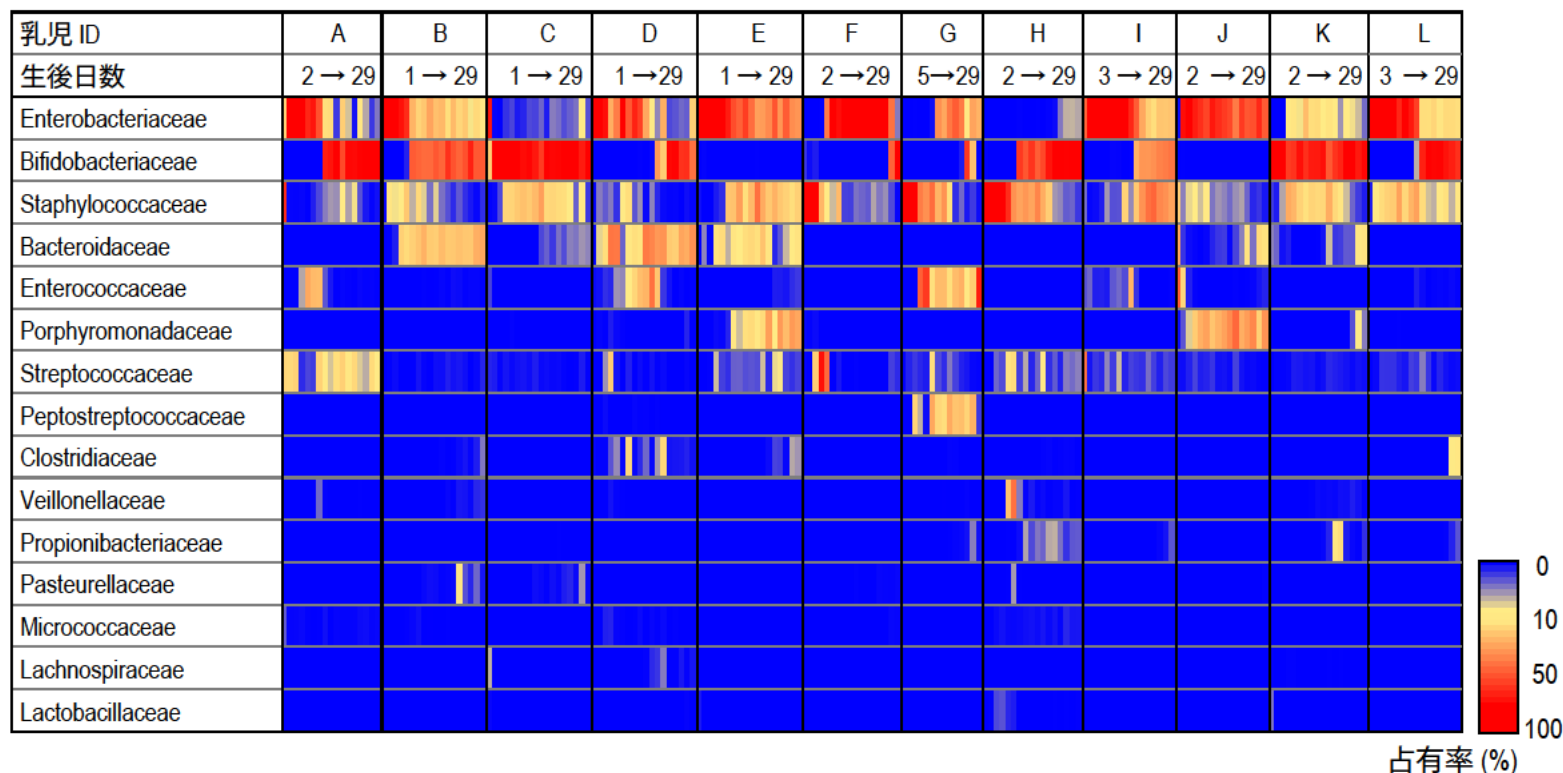
1. Wada J, *et al.* *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3996-4004 (2008).
2. Fukuda S, *et al.* Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**, 543-547 (2011).
3. Maslowski KM, *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**, 1282-1286 (2009).
4. Samuel BS, *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 USA* **105**, 16767-16772 (2008).
5. Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **72**, 2240-2247 (2004).
6. Kimura I, *et al.* Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 8030-8035 (2011).
7. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Nunez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* **14**, 685-690 (2013).
8. Stecher B, *et al.* Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. *PLoS Pathog* **6**, e1000711 (2010).
9. Dicksved J, Ellstrom P, Engstrand L, Rautelin H. Susceptibility to *Campylobacter* infection is associated with the species composition of the human fecal microbiota. *MBio* **5**, e01212-e01214 (2014).
10. 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).
11. Frost G, *et al.* The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun* **5**, 3611 (2013).



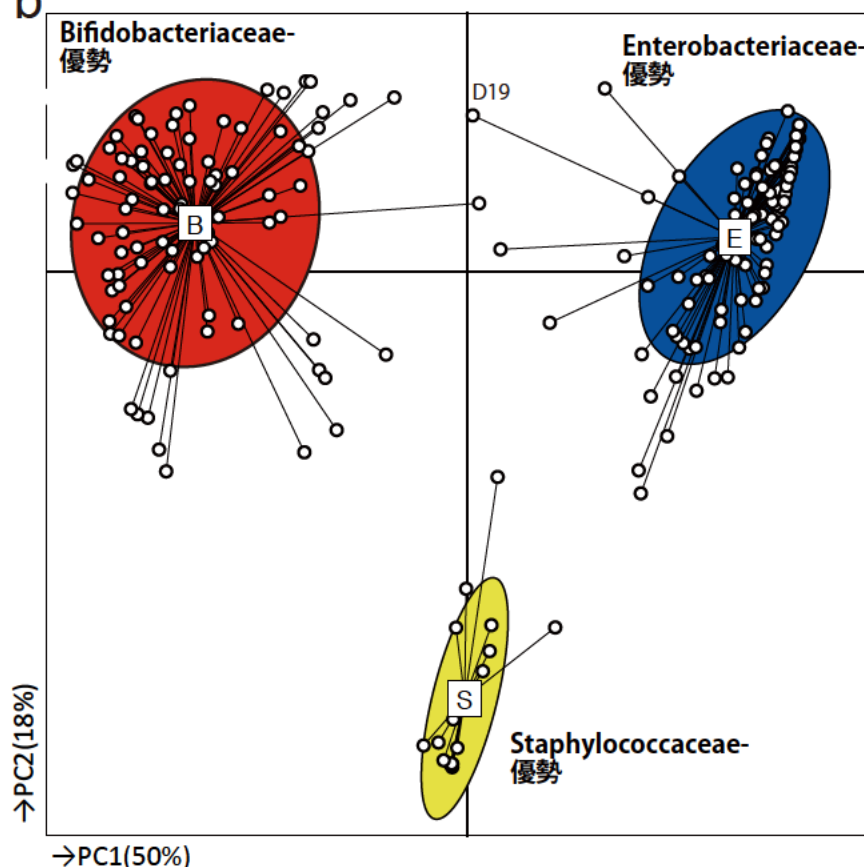
概念図。乳児腸内フローラ形成とビフィズス菌によるフコシルラクトース (FL) 利用の分子機構。

(a) 生後 1 か月間の乳児腸内フローラの形成過程には次のような特徴がある。乳児の腸内フローラは Staphylococcaceae、大腸菌群、ビフィズス菌のいずれかが最優勢であることを特徴とする 3 つのグループに分類される、ビフィズス菌優勢のフローラに不可逆的に移行する、その移行時期には個人差が認められる。(b) ビフィズス菌には母乳オリゴ糖を効率よく利用できる菌とできない菌が存在する。母乳オリゴ糖の主成分である FL の利用には、今回見出した FL 輸送体が重要な役割を果たしている。この FL 輸送体は、乳児の腸内の酢酸濃度と pH を規定する重要な遺伝子である。

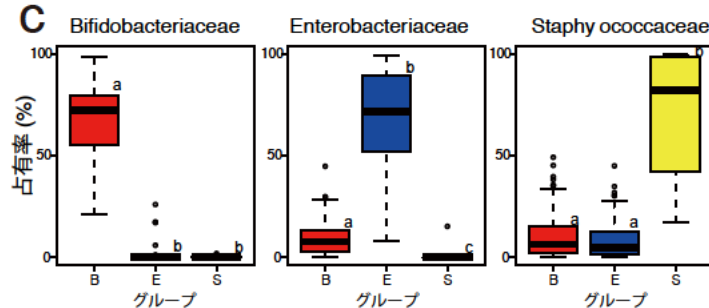
a



b



c

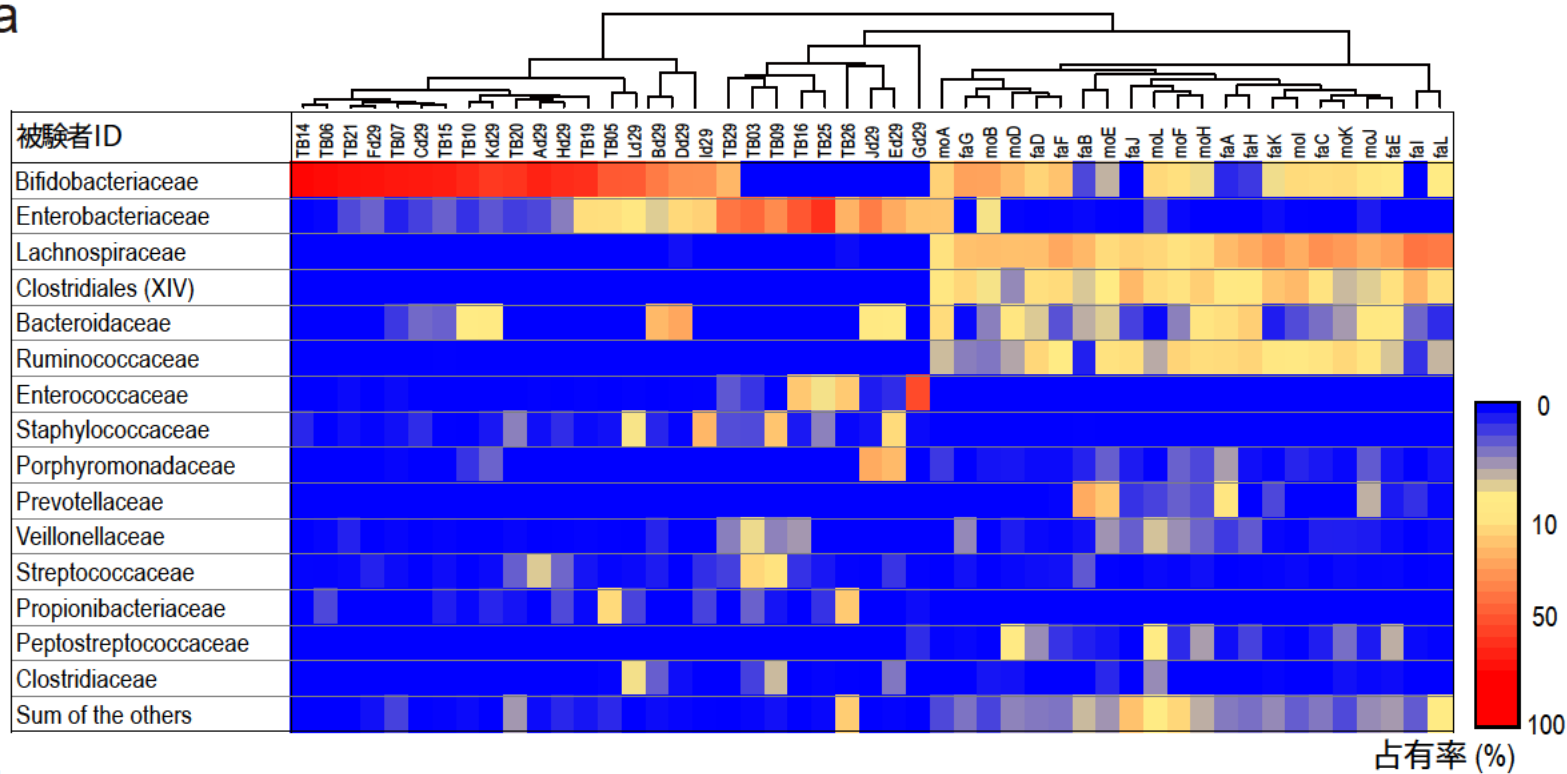


d

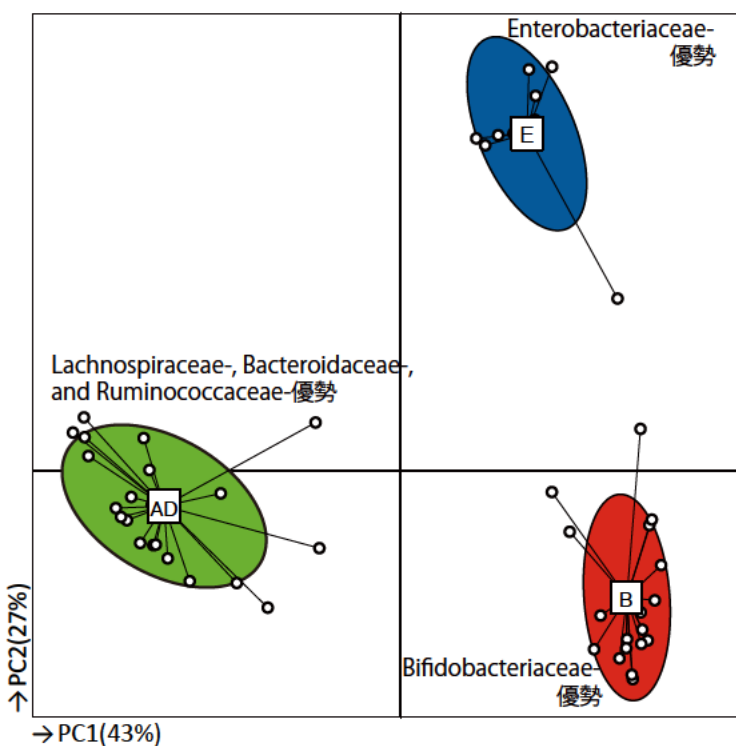
乳児 ID	生後日数																											
	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29										
J	-	S	E	-	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E									
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E									
F	-	S	S	S	S	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	B	B									
G	NT	NT	-	NT	S	S	S	S	S	S	E	E	E	B	B	B	B	E	E									
I	NT	NT	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	B	B	B	B	B	B	B									
D	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	B	E	B	B	B	B	B	B									
L	NT	NT	E	E	E	E	E	E	E	E	E	B	B	B	B	B	B	B	B									
A	-	S	E	E	E	E	E	E	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B									
H	NT	S	S	S	S	S	S	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B									
B	E	E	E	E	E	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B									
C	E	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B									
K	NT	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B									

図 1. 生後 1 か月間の乳児腸内フローラ構成の変化。(a) ヒートマップ解析結果：各被験者の生後 1 か月間の腸内フローラ構成を、時間経過に沿って左から右にカラーで示した。(b) 多変量&クラスター解析結果：白丸は被験者サンプル、四角は各グループの中心を示す。ビフィズス菌優勢、大腸菌群優勢、Staphylococcaceae が優勢のフローラを、それぞれ B(赤)、E(青)、S(黄)で示した。色づけされた楕円には各グループに属するサンプルの 67%が含まれる。(c) 各クラスターを特徴付ける菌種の占有率をボックスプロットにて比較した。ボックス右上の異なるアルファベット(a-c)は、群間で占有率が有意に異なることを示す(p<0.05、マンホイットニーU 検定)。(d) 生後の日数経過と優勢菌種の遷移。

a



b



c

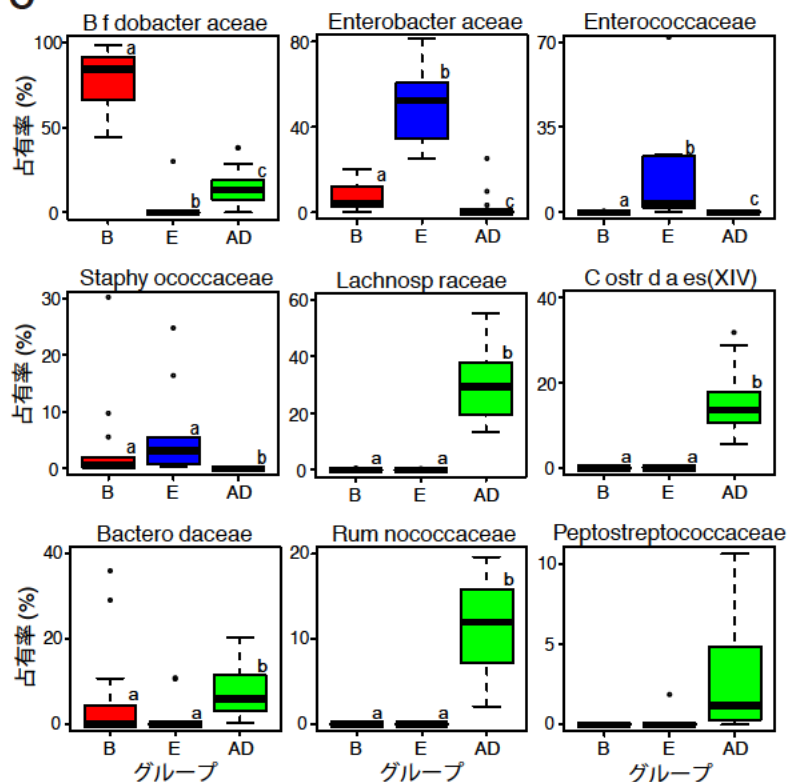
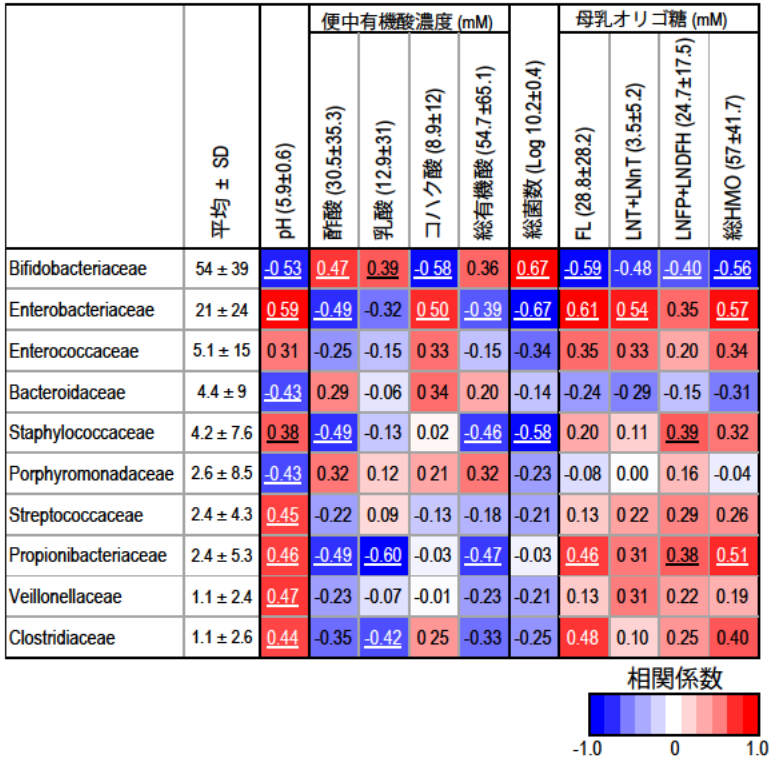
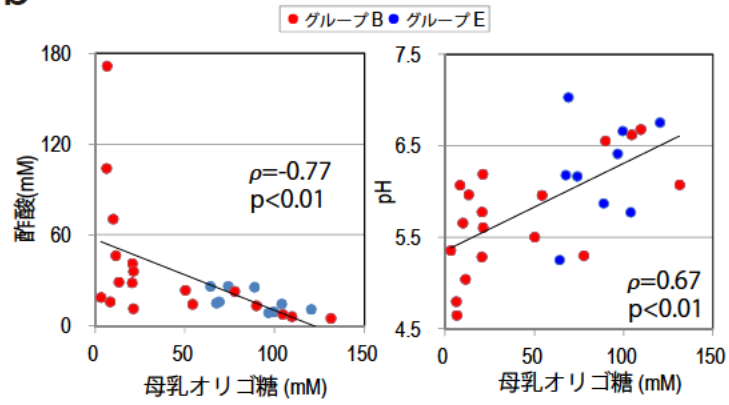


図2. 1 か月目の乳児(27 名)と成人(22 名)の腸内フローラ構成の比較。(a) ヒートマップ解析結果: 腸内フローラ構成に基づく階層的クラスタリングを行い、作成した樹形図を元にサンプルを並べ替えた(図上部)。(b) 多変量解析結果(PCoA&PAM): ビフィズス菌優勢、大腸菌群優勢、成人型フローラを、それぞれ B(赤)、E(青)、AD(黄緑)で示した。(c) 各クラスターを特徴付ける菌群の占有率をボックスプロットにて比較した。ボックス右上の異なるアルファベット(a-c)は、群間で占有率が有意に異なることを示す($p < 0.05$ 、マンホイットニーU 検定)。

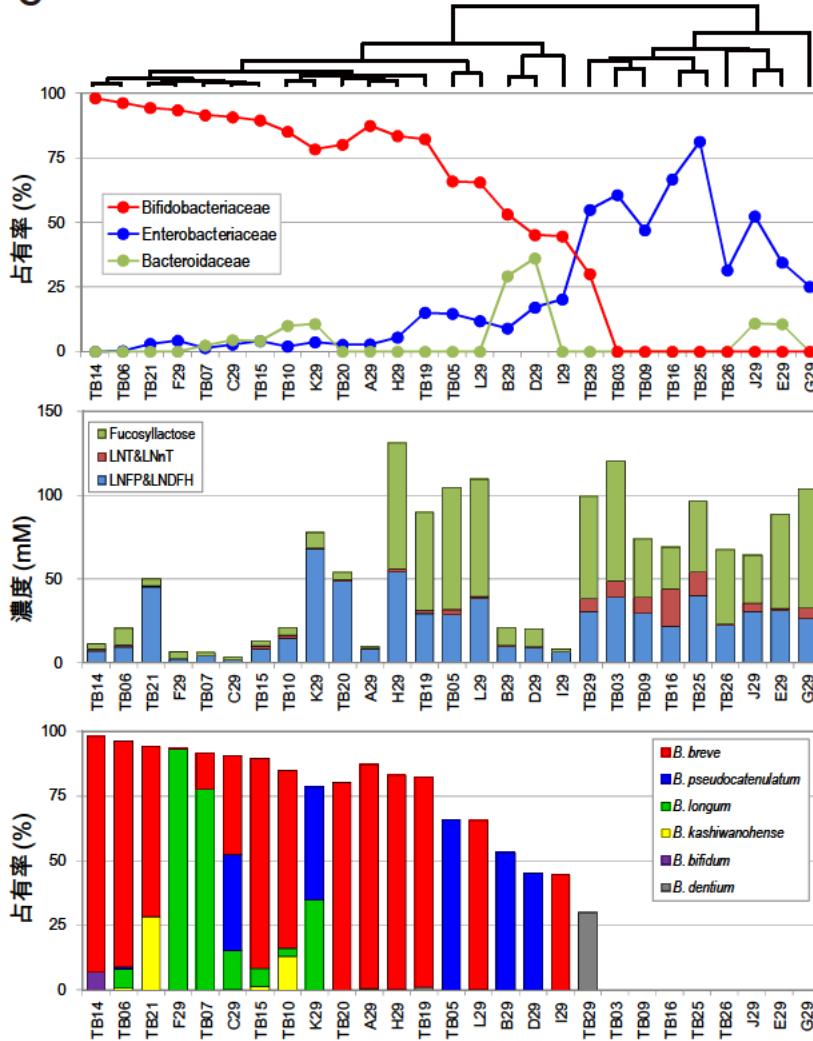
a



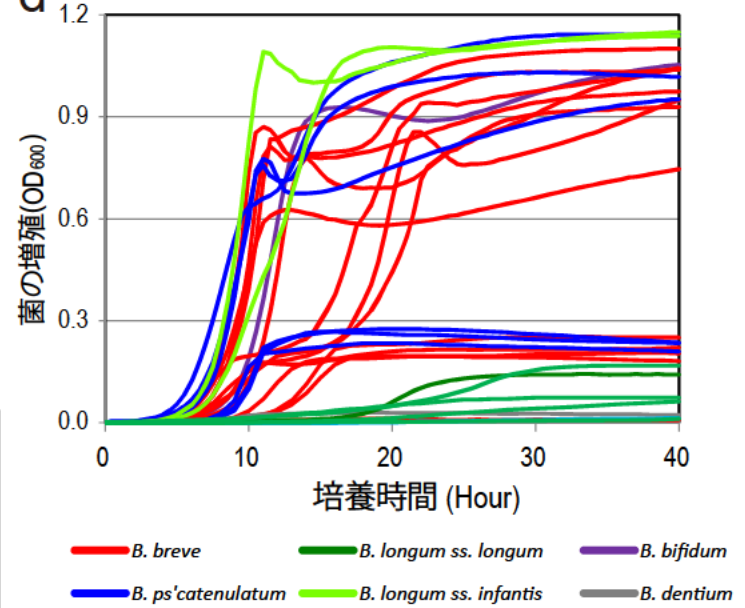
b



c



d



e

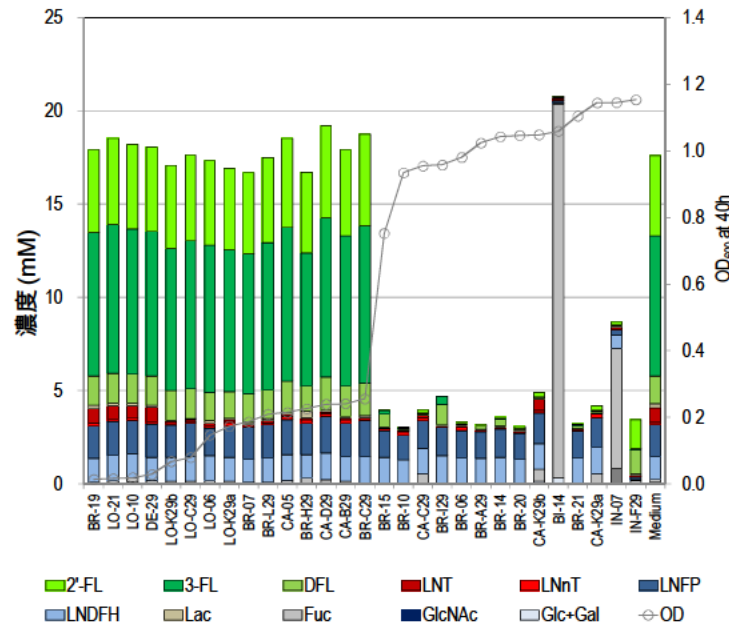
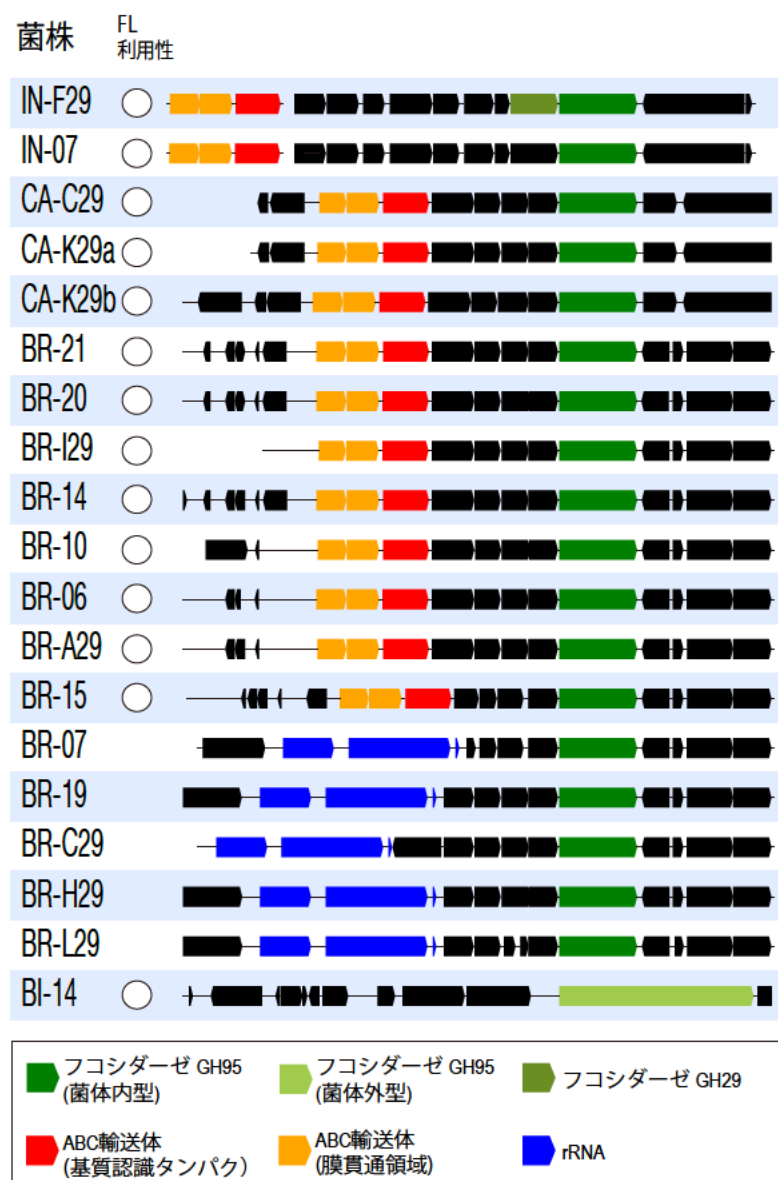
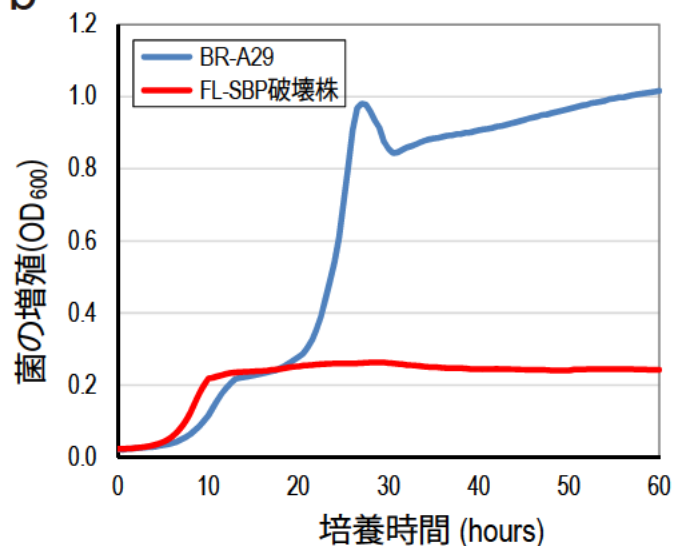


図3. 腸内フローラ構成と腸内環境の関連性。(a)スピアマンの順位相関係数: 腸内フローラ構成菌と腸内環境を比較した。(b)便中残存オリゴ糖濃度とpH値および酢酸濃度の関連性。(c)腸内フローラ構成と便中のオリゴ糖濃度、およびビフィズス菌種の占有率との関係。腸内フローラ構成に基づく階層的クラスタリングを行い、作成した樹形図を元にサンプルを並べ替えた(図上部)。(d)乳児から分離した29株のビフィズス菌を母乳オリゴ糖を唯一の糖源として培養した時の増幅曲線。(e)培養上清の残存オリゴ糖解析結果、顕著な増殖が認められた株では、母乳オリゴ糖の主成分のFLがほとんど消費されている。

a



b



c

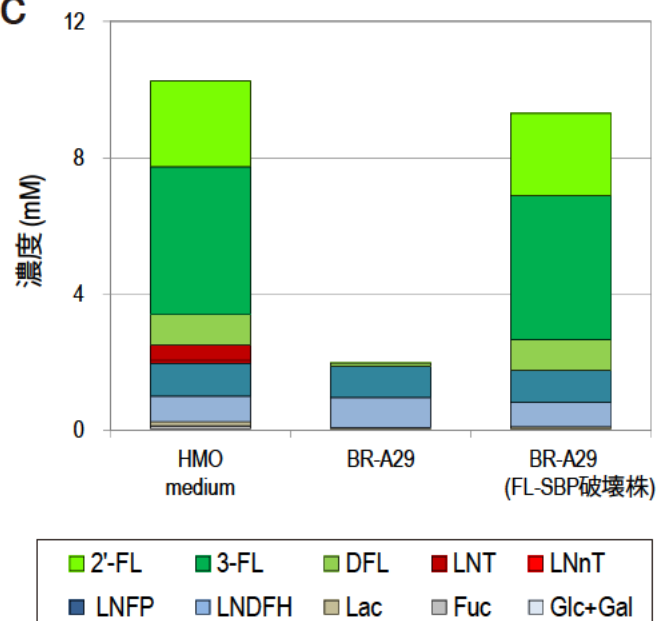


図4. 母乳オリゴ糖の利用に関わる遺伝子の同定。(a) フコシダーゼ遺伝子 (GH95 および GH29 ファミリー遺伝子) の近傍の遺伝子配置。矢印は遺伝子がコードされている方向性を示す。(b) フコシダーゼ近傍の ABC 輸送体 (FL-SBP) の遺伝子破壊株。(c) 培養上清の残存オリゴ糖解析結果。破壊株では、FL が利用できなくなっていることが確認された。

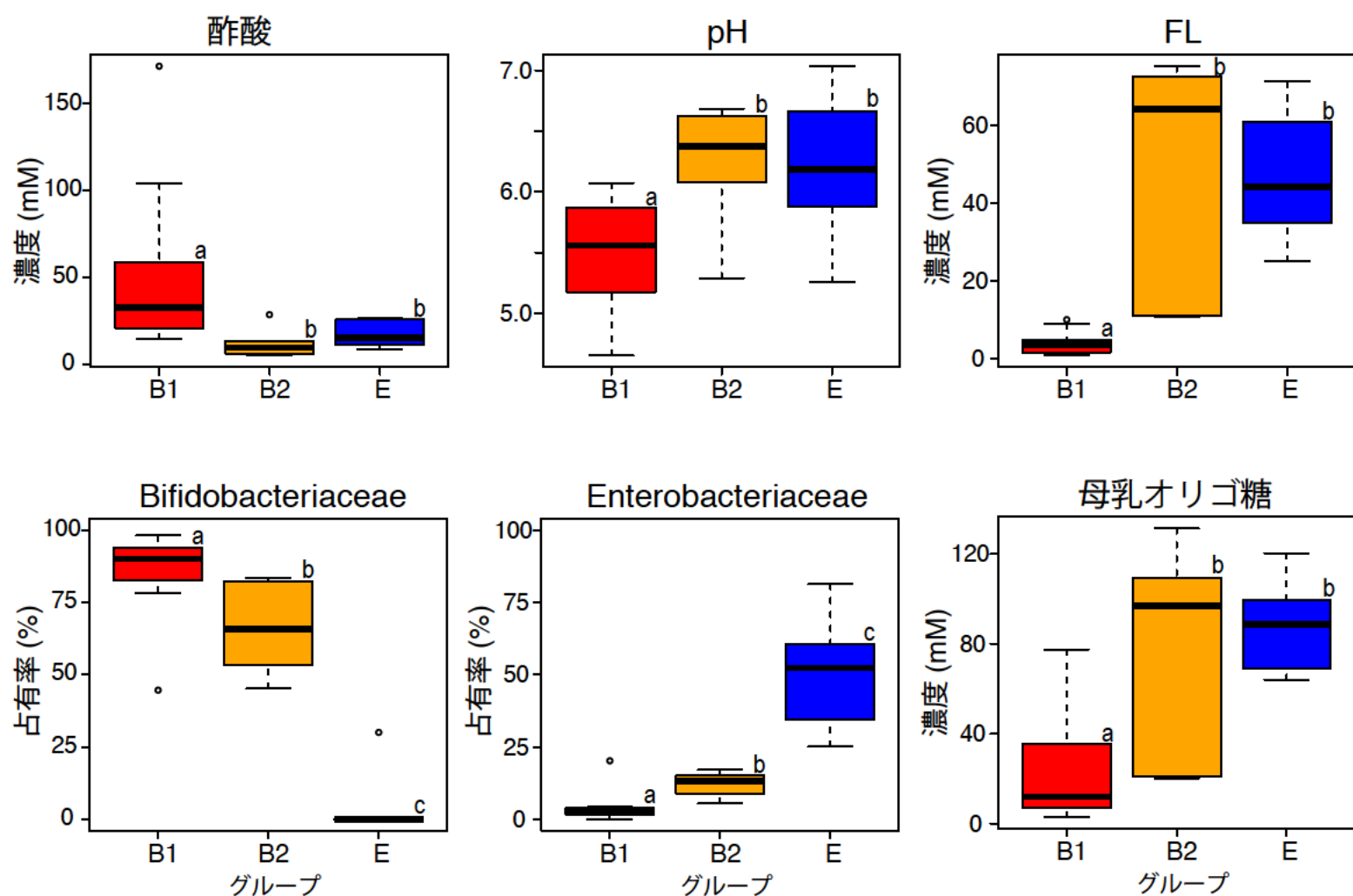


図5. FL 利用ビフィズス菌の定着による腸内微生物生態系への影響。FL 利用ビフィズス菌が優勢の乳児 (B1 グループ)、FL 非利用ビフィズス菌が優勢の乳児 (B2 グループ)、大腸菌群が優勢の乳児 (E グループ) の比較をボックスプロットで表した。ボックス右上の異なるアルファベット(a-c)は、群間で占有率が有意に異なることを示す($p < 0.05$ 、マンホイットニーU 検定)。

表 1. ビフィズス菌 29 株のドラフトゲノム解析結果の概要

菌株	ゲノムサイズ (Mbp)	予測 遺伝子数	HMO培地での 増殖性	フコシダーゼ		HG_2571
				GH29	GH95	ABC輸送体基質 認識タンパク
<i>B. breve</i> BR-06, BR-10, BR-14, BR-15, BR-20, BR-21, BR-A29, BR-I29 (8株)	2.2–2.7	1,928–2,368	+	-	+	+
<i>B. breve</i> BR-07, BR-19, BR-C29, BR-H29, BR- L29 (5株)	2.2–2.5	1,955–2,224	-	-	+	-
<i>B. longum</i> ss. <i>infantis</i> IN-07, IN-F29 (2 株)	2.6–2.7	2,356–2,441	+	+	+	+
<i>B. longum</i> ss. <i>longum</i> LO-06, LO-10, LO-21, LO-C29, LO-K29a, LO-K29b (6 株)	2.4–2.7	1,987–2,209	-	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i> CA-C29, CA-K29a, CA- K29b (3株)	2.2–2.5	1,825–2,168	+	-	+	+
<i>B. pseudocatenulatum</i> CA-05, CA-B29, CA- D29 (3株)	2.2–2.3	1,896–1,904	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> BI-14	2.2	1,779	+	+	+	-
<i>B. dentium</i> DE-29	2.6	2,127	-	+	-	-