

腸内細菌の消化管定着

Colonization of Intestinal Bacteria in the Gut

西山 啓太 *
KEITA NISHIYAMA*

慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地

* TEL: 03-5363-3769

* E-mail: keita.nishiyama@keio.jp

Department of Microbiology and Immunology Keio University School of Medicine,
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

キーワード：腸内細菌，定着，接着因子

Key words: intestinal bacteria, colonization, adhesion factor

(原稿受付 2020年3月16日 / 原稿受理 2020年4月26日)

1. ヒトに共生する腸内細菌の分布と局在

ヒトには自身の細胞数を遥かに超える 10^{15} もの細菌が棲息し、皮膚、口腔、気道、消化管、生殖器など各所で細菌叢を形成する。細菌あるいはそれらの代謝産物は、しばしば宿主細胞に刺激因子として捉えられるため、生体の恒常性維持と深くかかわる。とりわけ、大腸に棲息する細菌数は、 10^{13} ~ 10^{14} と最も多い。それは、温度や低酸素環境が一定に維持され、栄養成分が供給される、嫌気性細菌にとって都合の良い環境だからである¹⁾。

大腸に生息する細菌種は、Firmicutes および Bacteroidetes 門が主であり、Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia 門に属する細菌種が続く。これらの構成比は、宿主の食生活、すなわち細菌にとっての栄養源に大きく影響を受け、例えば、高タンパク・高脂肪の西洋食を摂ると *Bacteroides* 属細菌が増加し、一方、食物繊維の豊富な食事では *Prevotella* 属細菌が増加する²⁾。興味深いことに、食生活のような外的要因により構成種が変わっても、細菌叢全体で検出される炭水化物代謝や ATP 産生、タンパク質合成など、細菌の生命維持に関わる必須遺伝子の割合は驚くほど保たれている³⁾。これは、細菌が互いの生存に必要な機能を補いながら共生し、細菌叢バランスを維持していることを意味している。

しかし、大腸と一言で表しても、ミクロの視点で観察すると、例えば、管腔（ルーメン）と腸上皮では細菌の分布や特徴が異なる⁴⁾。腸上皮は、杯細胞から分泌されたムチンが大量に存在する。ムチンはゲル化することで、ヒトでは 0.7~1 mm にもなる粘液層を形成し、排泄物による物理的接触から腸上皮を保護したり、宿主細胞への細菌の侵入（感染）を妨げる。この粘液層には、ムチンと親和性の高い *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides acidifaciens*, *Bacteroides fragilis*, Bifidobacteriaceae に代表される細菌種が局在している。これ

らの多くは、糖質分解酵素により、複雑な構造のムチン O-グリカンを分解し、炭素源として利用できるムチン分解菌 (mucolytic bacteria) としての特徴を有する。実際に、fluorescent in situ hybridization (FISH) 法によるマウスの粘液層の細菌の局在を観察すると、*Bacteroides* 属細菌が多数検出される (図 1)。これらの細菌は、ムチンと相互作用するための adhesion factor (接着因子) を有しており、例えば、*B. fragilis* は、commensal colonization factor (CCF) と名付けられた菌体表層タンパク質を介して粘液層に接着できる。興味深いことに、*B. fragilis* が定着したマウスに抗生物質を投与すると、CCF を持つ *B. fragilis* は粘液層の深くに入り込むことで抗生物質からの殺菌を回避し、抗生物質投与を止めると再び腸内で増加することが示されている⁵⁾。大腸は、蠕動運動によって圧縮された排泄物が塊となり通過し、蠕動波に合わせルーメン細菌叢は大きく変動する。そのため、粘液層に接着できる細菌が、いわば種菌のような役割を果たし、大腸内での細菌叢形成の均衡性を保つ鍵となると考えられている (図 1)。

2. 腸内細菌とムチンとの相互作用の解析

大腸の主なムチンは、MUC2 と呼ばれる分泌型ムチンである。MUC2 は、5,179 アミノ酸残基からなるモノマーが基本単位となる。MUC2 は、トレオニン、セリン、プロリンがリッチなタンデムリピート構造を含む PTS ドメインを有する。PTS ドメインには、O-グリコシド型糖鎖が高度に付加され、大腸では、コア 3 または 4 型と呼ばれる糖鎖構造 (GlcNAc β 1,6(GlcNAc β 1,3)GalNAc α Ser/Thr) が基本となり、これらに、GlcNAc, GalNAc, フコース、シアル酸あるいは硫酸基が結合し修飾され、多様な糖鎖構造を形成している⁶⁾。続いて、MUC2 の N-および C-末端に含まれるシステイン残基を介して、ジ

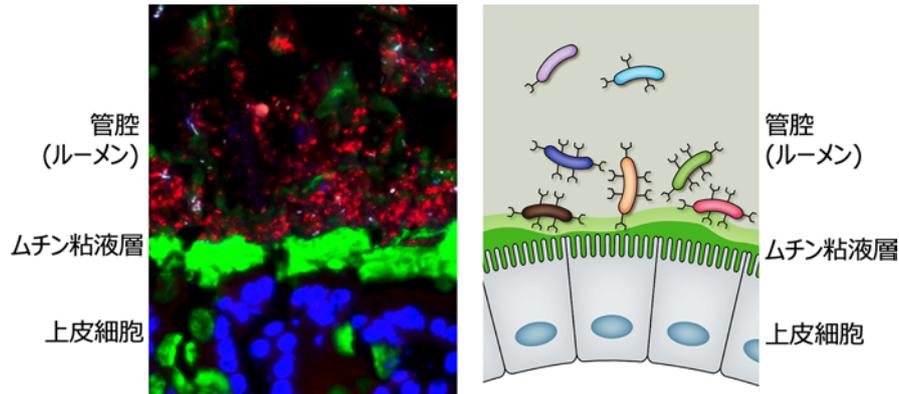


図1. 粘膜層における腸内細菌の局在と接着

(左) FISH 法によるマウスの粘液層に接着した腸内細菌の観察。赤色が腸内細菌 (*Bacteroides* 属), 緑色が腸粘液ムチン, 青色が上皮細胞。(右) 腸内細菌が接着因子を介して粘液層 (ムチン) に接着するイメージを示した (academist Journal (<https://academist-cf.com/journal/?p=1132>) より改変転載)。

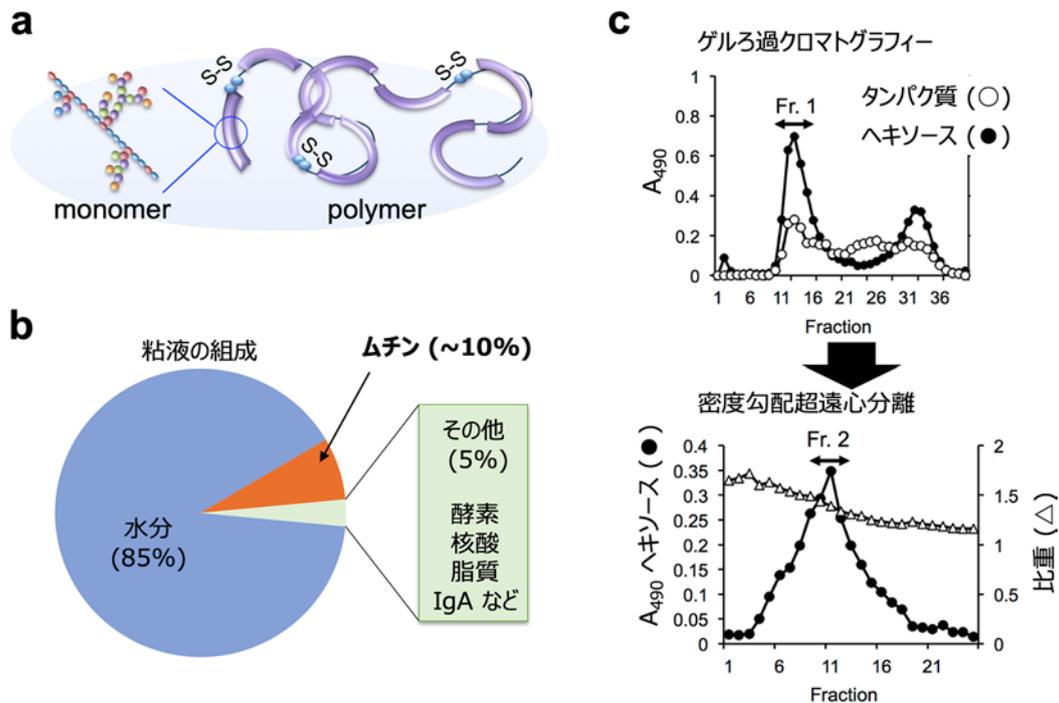


図2. ムチンの生化学的特徴と精製過程

(a) MUC2 ムチンは、アミノ酸骨格に *O*-グリコシド結合で糖鎖が付加された構造を monomer とし、これがジスルフィド (S-S) 結合することで巨大なネット状の polymer を形成する。(b) 粘液に含まれる主な物質を示した。ムチンは重量比の約 10% である。(c) ブタ大腸からのムチンの精製過程。粘液をゲル濾過クロマトグラフィーにより高分子画分を分画し (Fr.1, 粗精製ムチン), 次いで密度勾配超遠心分離にかけることで、比重 1.4 付近の精製ムチン (Fr. 2, 精製ムチン) を得ている (文献より一部改変転載)。

スルフィド結合を形成し、巨大なネット状のポリマー構造をとる (図 2a)。このような生合成過程で作られたムチンは、杯細胞から分泌され、下部消化管では 3 ~ 5 時間の間隔でターンオーバーが生じる。このムチン水溶液は、20 mg/mL 以上で粘性を示し、50 mg/mL でゲル状になることから、いかに腸内にムチンが豊富に存在するか窺い知ることができる。一方、そのゲル状の性質から、リゾチーム、ディフェンシン、核酸、IgA など様々な夾雑物を含む不均一な物質であるため (図 2b)、実験的にムチンと細菌の接着を定量的に評価する際の律速となっていた。

そこで、我々は次のような方法で消化管から高純度なムチンを精製している。まず、ブタの大腸からスクレイパーにより粘液層を剥離し、界面活性剤を加えたのち、遠心分離で残渣を取り除き、ゲル濾過カラムにより高分子画分を得る (図 2c, Fr. 1)。この段階では、タンパク質に対する糖の割合は 20% 程度であり (粗精製ムチン)、市販されているムチンと大差ない。次に、脂質、核酸、タンパク質等の夾雑物を除去するために、グアニジン塩酸を加えたのち、塩化セシウムによる密度勾配超遠心分離に 120 時間かけることで、糖含量 70% ほどの高純度なムチン画分を回収できる (図 2c, 精製ムチン、

Fr. 2)⁷⁾。

この精製ムチンを細菌の接着性評価に用いることで、夾雑物の影響を最小限に抑え、再現性のよい解析が可能となった。実際に、20菌株の *Bifidobacterium* 属細菌のムチンに対する接着性の評価を表面プラズモン共鳴 *Biacore* を用いて実施した。予想通り、ムチンの精製純度は細菌の接着性に大きな影響を及ぼし、粗精製ムチンと精製ムチンでは接着性が数倍変化することも認められた。特に、精製ムチンに対して高い接着性を示した菌株は、特定のムチン糖鎖構造を認識することを強く示唆するデータが得られ、粘液層（ムチン）に特異的かつ強く相互作用できる細菌種の絞り込みと、接着分子機構を詳細に解析する技術基盤を確立している⁸⁾。

3. 腸内細菌の菌体表層構造とムチン接着因子

ここからは、腸内細菌のムチンへの接着分子について話を進めていきたい。図3には、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* の電子顕微鏡像を示した。走査型電子顕微鏡 (SEM) により表層構造を観察すると、凹凸のある菌体の表面に、多糖やメンブレンベシクル (膜小胞) のような構造物が観察される (図3a)。さらに、同菌株の超薄切片を作製し断面構造を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察すると、菌の周囲に明瞭な細胞壁と、そこから長く伸びる線毛が認められる (図3b)。このように菌体表層を覆う様々な構造物は、細菌と外界 (ここではムチンや粘液層) との最初の相互作用に関わることから、接着因子としての性質をもつことが多く、それぞれの菌株の特徴を知る重要な要素となる。

例えば、海洋細菌である *Vibrio cholerae* は、主に toxin-coregulated pili (TCP 線毛) と GlcNAc 結合外膜タンパク質の二つの接着因子を有し、ヒトの消化管下部の上皮細胞やムチンに接着することで病原性を発揮する (Krebs らにより *V. cholerae* が細胞に接着する様子が鮮明に観察されているので是非ご覧いただきたい⁹⁾)。一方、接着因子が欠損した *V. cholerae* は腸には定着できず単なる通過菌となる。すなわち、接着因子の有無が *V. cholerae* の病原菌としての表現型の鍵となるのである。

我々も、精製ムチンを用いた解析から、*Bifidobacterium* 属のユニークな接着機構を見出している。シ

アリダーゼは、ムチン糖鎖に結合したシアル酸残基を切断する加水分解酵素である。ヒトから高頻度に検出される *Bifidobacterium* 属上位8菌株のうち、*B. bifidum* のみが細胞膜結合型のシアリダーゼ (SiaBb2) を発現している。*B. bifidum* siaBb2 欠損株ではムチンへの接着性が顕著に低下し、SiaBb2 が *B. bifidum* のムチン接着性に大きく寄与していた。しかし、一般的に酵素によるムチンへの結合は、基質認識のための一時的なものであることが多く、持続的な細菌の接着に寄与するケースは少ない。

そこで、SiaBb2 の結合機構の解析を試みたところ、シアリダーゼ阻害剤を添加しても SiaBb2 のムチンへの結合は、ほとんど影響を受けなかった (図4)。このことは、シアル酸の切断とムチンへの結合は、異なる機構で生じると推察された。次に、糖鎖アレイを用いて受容体解析を実施した結果、SiaBb2 は、シアロ糖鎖に加え、A 抗原に結合した。Biacore による SiaBb2 と糖鎖の二分子間相互作用解析では、シアロ糖鎖への結合はシアリダーゼ阻害剤の添加で顕著に低下したが、A 抗原への結合は影響を受けなかった (図4)。すなわち、SiaBb2 が基質 (シアル酸) とは異なる糖鎖構造 (A 抗原) に結合できることが SiaBb2 の持続的な接着に寄与しており、糖質分解酵素の接着因子としての新たな分子機構を明らかにした¹⁰⁾。

ABO 抗原の分布は、日本人では A 型が約 40% と最も多く、次いで O 型、B 型、AB 型となる。*Bifidobacterium* は有用菌として経口的に摂取されることが多いが、個人間による定着性の違いがしばしば指摘される¹¹⁾。*Helicobacter pylori* が個人の血液型抗原を認識し棲み分けているように、*B. bifidum* においても SiaBb2 を介した個人特有の糖鎖を標的とした定着機構があるのではないかと予想している。

4. 腸内細菌の第3の接着因子

これまで紹介した *V. cholerae* の TCP 線毛や *B. bifidum* のシアリダーゼは、いわゆる菌体表層タンパク質であり、N 末端に分泌のためのシグナル配列、C 末端に細胞壁あるいは膜結合モチーフが保存され、これらの配列依存的に局在様式が決まる (図6を参照)。しかし、こ

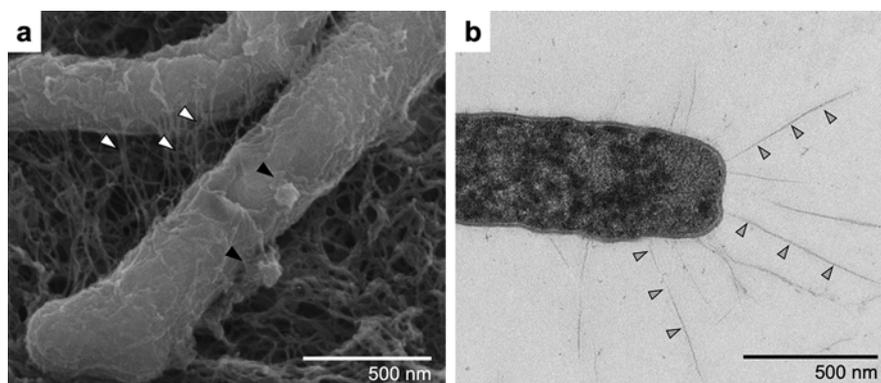


図3. *Bifidobacterium longum* の電子顕微鏡による観察像

(a) SEM による *B. longum* の観察像。菌体表面に多糖 (△) やメンブレンベシクル (▲) 様の構造物が確認できる。(b) TEM による *B. longum* の超薄切片の観察像。細胞壁から長く伸びた線毛 (▲) が確認できる。

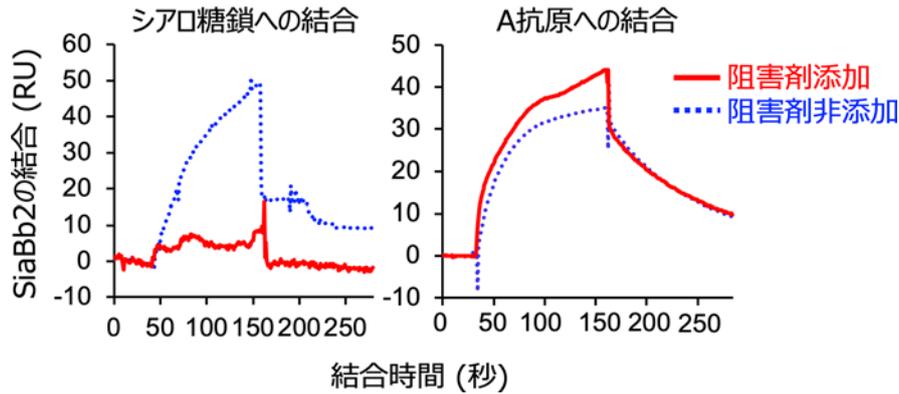


図4. *Bifidobacterium bifidum* のシアリダーゼ (SiaBb2) のシアロ糖鎖と A 抗原への結合
表面プラズモン共鳴 Biacore を用いた SiaBb2 タンパク質の各糖鎖に対する結合シグナル (RU: Resonance Unit) を示した。シアリダーゼ阻害剤での添加により (実線), シアロ糖鎖への結合が顕著に低下する (文献¹⁰より改変転載)。

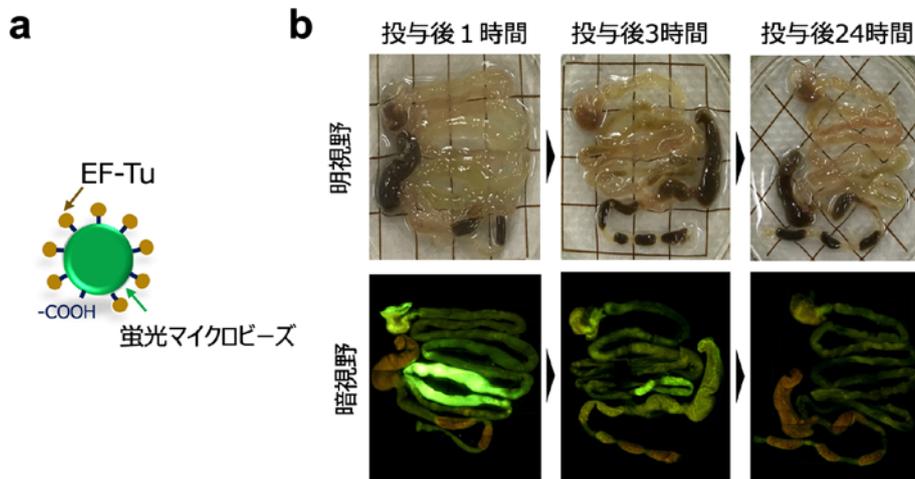


図5. マウス消化管の透明化処理による蛍光ビーズの観察

(a) 蛍光ビーズ (直径 $1.5 \mu\text{m}$) に EF-Tu タンパク質を固定した擬似細菌モデルを作製した。(b) マウス消化管における EF-Tu 固定蛍光ビーズの様子。上段: 明視野での透明化処理後の消化管の観察。下段: 暗視野での消化管における蛍光ビーズの観察。時間経過とともに, 蛍光シグナルが消化管下部へと移行する様子が確認できる (文献¹⁴より一部改変転載)。

のような配列やモチーフのない細胞内タンパク質が, 菌体外に分泌され菌体表層にとどまることで, あたかも表層タンパク質のように機能する。これらは, 本来の機能に加え, 異なる役割をもつ多機能の意味から **moonlighting factor** (ムーンライティング因子) と呼ばれ, 腸内細菌の第3の接着因子として注目されている。

実際, 細菌におけるムーンライティング因子の役割は, 接着因子としての報告例が大半を占め, 例えば, *Lactobacillus reuteri* の翻訳伸長因子 (EF-Tu) は, リボソーム上でタンパク質合成にかかわる因子であるが, 細胞外へと分泌され, ムチンの硫酸化糖鎖に結合するレクチンとして機能する。これまで, 単なる偶然だと考えられていたムーンライティング因子の機能であるが, EF-Tu 以外にも, グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素やシャペロニン GroEL など, 数十種類もの接着因子としてのムーンライティング因子が報告されている¹²⁾。

しかし, ムーンライティング因子が最初に報告されてから 20 年以上経つにもかかわらず, 未だに, 細菌の消化管への接着に本当に必要か? という疑問に対して, 明確な結論は得られていない。その主な理由は, ①多くの

ムーンライティング因子は細菌の生育に必須であり, 遺伝子変異株の作出が容易ではないこと, ②ムーンライティング因子は, 菌体表面に電荷により局在していることが多く, どの細菌が分泌したか区別が難しいこと, ③菌体外への分泌機序がほとんど不明なことである。

一方, 細胞質内タンパク質は, 大腸菌を用いたタグ付き組換えタンパク質として比較的容易に発現・精製できる。我々はこの性質に着目し, 組換えタンパク質を作製し, これをカルボキシ基を導入した蛍光マイクロビーズに固定することで“擬似細菌”を作製した (図 5a)。ビーズを細菌に見立てた擬似細菌のメリットは, 一種類のタンパク質を固定化することで, ムーンライティング因子の解析では律速となっていた, 標的因子の役割に焦点を絞り解析できるという点にある。

さらに, 生体内での蛍光ビーズの挙動を可視化するため, マウスの消化管を飽和フルクトース溶液を用いた SeeBD 法¹³⁾ により組織透明化処理した。これを蛍光顕微鏡下で観察することで, 特別なイメージング装置を用いることなく, マウス消化管での継続的な蛍光ビーズの挙動を可視化することに成功した (図 5b)。驚くこと

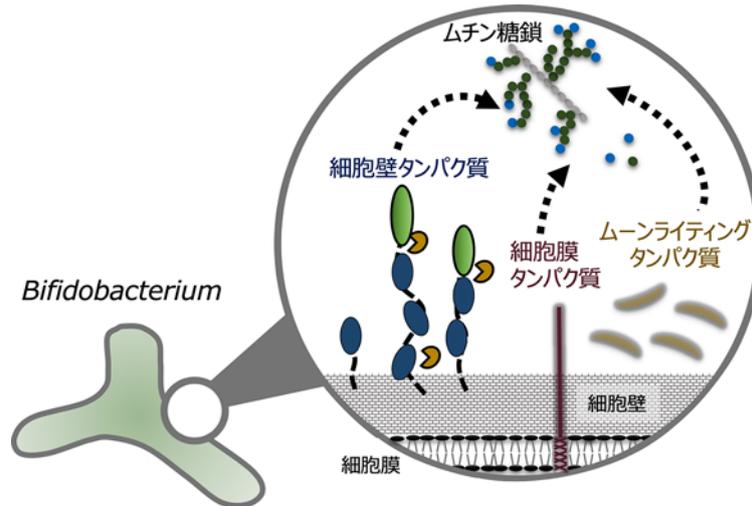


図 6. *Bifidobacterium* の接着因子として報告される菌体表層タンパク質の局在様式
Bifidobacterium では、(i) 細胞壁にアンカリングされる細胞壁タンパク質（線毛など）、(ii) 細胞膜タンパク質（糖質分解酵素など）、(iii) アンカーを持たないムーンライティング因子（elongation factor-Tu など）が接着因子として特徴づけられている。これらが、異なるレクチン様の性質をもち、宿主のムチン糖鎖に対する接着因子として機能すると考えられる。

に、分裂も増殖もしない蛍光ビーズが、投与後 24 時間以降も長くマウスの腸内に留まった。このことは、腸内において EF-Tu のようなムーンライティング因子が細菌の定着を促進することを *in vivo* で証明したものであり、消化管定着における接着因子の重要性を強調する結果となった¹⁴⁾。

5. 最後に

本稿では、腸内細菌のムチンへの接着性にかかわる分子について紹介した。大腸の MUC2 ムチンに修飾される糖鎖構造の多様性は、じつに 100 種類以上にも及ぶ。また、図 6 には *Bifidobacterium* 属で報告される接着因子の例を示したが、一種類の細菌がこのような複数の接着因子をもつことで、ムチン糖鎖の多様性に応じた接着性を発揮でき、これが腸内細菌の生き残り戦略であると考えている。

さらに、透明化実験による全消化管を対象としたマクロ解析では、蛍光ビーズの局在は消化管部位で大きく異なり、これは各部位での糖鎖の違いを接着因子が認識したことによると推察された。最近、GlycomeAtlas (<https://glycosmos.org>) 等の糖鎖データベースが整備されつつあり、ヒトやマウスの消化管部位で発現する糖鎖構造を詳細に知ることができる。したがって、今後、宿主の糖鎖構造と細菌の接着因子の性質を統合的に解析していくことで、細菌が種菌として、どのような接着因子を介して、腸内のどこに接着しているかという、ヒト腸内細菌叢形成のメカニズムに迫ることができると期待している。

謝 辞

本稿で取り上げた研究の多くは、岡田信彦教授（北里大学薬学部 微生物学教室）と向井孝夫教授（北里大学獣医学部 細胞分子機能学研究室）との共同研究により行われました。細菌の電子顕微鏡観察は高木孝士講師

（昭和大学）、組織透明化解析は杉山真言助教（北里大学）にご協力いただきました。また、日頃の実験をサポートして下さった所属研究室の教員、学生、多くの共同研究者の皆様にご感謝の意を表します。本研究は、JSPS 科研費（15H06581, 17K15249）、公益財団法人発酵研究所、学校法人北里研究所の助成を受けたものです。なお、本稿は、日本乳酸菌学会誌 2019 年度秋期セミナーの筆者の総説と一部重複する部分があります。

文 献

- 1) Donaldson, G.P., S.M. Lee, and S.K. Mazmanian. 2015. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(1): 20–32.
- 2) Gorvitovskaia, A., S.P. Holmes, and S.M. Huse. 2016. Interpreting *Prevotella* and *Bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome.* 4: 15.
- 3) Lozupone, C.A., J.I. Stombaugh, J.I. Gordon, J.K. Jansson, and R. Knight. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* 489(7415): 220–230.
- 4) Pédrón, T., C. Mulet, C. Dauga, L. Frangeul, C. Chervaux, G. Grompone, and P.J. Sansonetti. 2012. A crypt-specific core microbiota resides in the mouse colon. *mBio.* 3(3): e00116–12.
- 5) Lee, S.M., G.P. Donaldson, Z. Mikulski, S. Boyajian, K. Ley, and S.K. Mazmanian. 2013. Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature.* 501(7467): 426–429.
- 6) Johansson, M.E., J.M. Larsson, and G.C. Hansson. 2011. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 15(108): 4659–4665.
- 7) Nishiyama, K., A. Kawanabe, H. Miyauchi, F. Abe, D. Tsubokawa, K. Ishihara, Y. Yamamoto, and T. Mukai. 2014. Evaluation of bifidobacterial adhesion to acidic sugar chains of porcine colonic mucins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78(8): 1444–1451.
- 8) Nishiyama, K and T. Mukai. 2019. Adhesion of *Lactobacillus* to intestinal mucin. pp. 159–166. *Methods Mol. Biol.* vol. 1887. Humana Press, New York, NY.
- 9) Krebs, S.J. and R.K. Taylor. 2011. Protection and attachment

- of *Vibrio cholerae* mediated by the toxin-coregulated pilus in the infant mouse model. *J. Bacteriol.* 193(19): 5260–5270.
- 10) Nishiyama, K., Y. Yamamoto, M. Sugiyama, T. Takaki, T. Urashima, S. Fukiya, A. Yokota, N. Okada, and T. Mukai. 2017. *Bifidobacterium bifidum* extracellular sialidase enhances adhesion to the mucosal surface and supports carbohydrate assimilation. *mBio.* 8(5): e00928–17.
 - 11) Zmora, N., G. Zilberman-Schapira, J. Suez, U. Mor, M. Dori-Bachash, S. Bashardes, E. Kotler, M. Zur, D. Regev-Lehavi, R.B. Brik, S. Federici, Y. Cohen, R. Linevsky, D. Rothschild, A.E. Moor, S. Ben-Moshe, A. Harmelin, S. Itzkovitz, N. Maharshak, O. Shibolet, H. Shapiro, M. Pevsner-Fischer, I. Sharon, Z. Halpern, E. Segal, and E. Elinav. 2018. Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. *Cell.* 174(6): 1388–1405.
 - 12) Nishiyama, K., M. Sugiyama, and T. Mukai. 2016. Adhesion properties of lactic acid bacteria on intestinal mucin. *Microorganisms.* 4(3): E34.
 - 13) Ke, M.T., S. Fujimoto, and T. Imai. 2013. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci.* (8): 1154–1161.
 - 14) Nishiyama, K., M. Sugiyama, H. Yamada, K. Makino, S. Ishihara, T. Takaki, T. Mukai, and N. Okada. 2019. A new approach for analyzing an adhesive bacterial protein in the mouse gastrointestinal tract using optical tissue clearing. *Sci. Rep.* 9(1): 4731.