

大麦  $\beta$ -グルカンレスポonderに特異的な腸内細菌による  
 $\beta$ -グルカン代謝機構の解明

群馬大学 食健康科学教育研究センター

杉山 友太

食物繊維は、抗肥満や抗糖尿病など数多くの保健効果が報告されている<sup>1)</sup>。食餌成分の一群である。食物繊維は、ヒトの消化酵素耐性であるため摂取後、大腸へと到達し腸内細菌による分解・資化を受ける。これまでに、腸内細菌叢および腸内細菌の代謝物が食物繊維の保健効果を担っており、腸内細菌叢が食物繊維の保健効果の発現に重要な因子であることが明らかになった<sup>2)</sup>。一方で、腸内細菌叢は、2,000 種以上<sup>3)</sup>、細胞数にして約 40 兆<sup>4)</sup>の腸内細菌から構成され、個人差が大きいと、全てのヒトが食物繊維の保健効果を一様に得ることが難しく、保健効果を得られるヒト（レスポnder）と得られないヒト（ノンレスポnder）が存在する。この問題を克服するためには、食物繊維の保健効果を担う腸内細菌種に特徴的な食物繊維代謝機構を詳細に解明し、制御すべき標的を具体化することが不可欠である。しかし、腸内細菌による食物繊維代謝には、不明な点が数多く残されている。

本研究では、食物繊維の中でも大麦に含まれる  $\beta$ -グルカン（Barley  $\beta$ -グルカン，BGL）に焦点を当てた。BGL は、グルコースを構成単糖として、 $\beta$ 1-3 および  $\beta$ 1-4 結合から成る水溶性食物繊維である。BGL は、食後の血糖値上昇抑制作用<sup>5)</sup>をはじめ、種々の保健効果が報告されている。しかし、BGL にもレスポnderとノンレスポnderが存在することが報告されている。*Prevotella copri*（現 *Segatella copri*）は、BGL レスポnderの腸内に多く、ノトバイオトマウス実験を用いて *S. copri* による BGL の分解・資化とその結果生じる代謝物産生が BGL の保健効果に重要であることが報告されている<sup>5)</sup>。このため、個人の腸内の *S. copri* の存在量を指標とした BGL の保健効果予測の開発が期待されるが、*S. copri* は、株間で糖質資化能が異なる<sup>6)</sup>ため 16S rRNA 遺伝子を用いた菌叢解析では、BGL 資化に関与しない株も検出されるため正確な予測は極めて難しい。BGL の保健効果を正確に予測するためには、BGL 資化を行う実行分子であるタンパク質およびそれらをコードする遺伝子の解明が必須であるが、*S. copri* の BGL 資化における分子機構は不明である。そこで本研究は、*S. copri* JCM 13464<sup>T</sup> をモデル株として、未解明であった *S. copri* による  $\beta$ -グルカン代謝機構を遺伝子・タンパク質レベルでの解明を目指した。加えて、*S. copri* が  $\beta$ -グルカンを資化時に特異的に産生し、宿主への保健効果を担うと予想される代謝物の同定を試みた。

## 【実験方法】

### *S. copri* の BGL 分解活性評価

*S. copri* JCM 13464<sup>T</sup> は、理化学研究所 バイオリソースセンター 微生物材料開発室より購入した。*S. copri* の前培養は Gifu anaerobic medium（GAM，日水製薬）を使用し、37℃ にてアネロパックケンキ（三菱ガス化学）を用いて作製した嫌気条件下で行った。本培養培地は、終濃度 0.1%となるよう種々の糖を添加した糖分解測定用 GAM を用いた。前培養液

10  $\mu$ L を 1 mL の本培養培地に添加し、37°C、嫌気条件下で 24 時間培養し、本培養液 100  $\mu$ L を OD<sub>600</sub> 測定に使用し、残り 900  $\mu$ L より菌体を回収した。回収した菌体を 40 mM リン酸カリウムバッファー (KPB) (pH 6.5) で 2 回洗浄後、同バッファーに懸濁し、超音波処理により細胞破碎液を調製した。細胞破碎液を遠心 (18,000  $\times$ g, 4°C, 10 min) し、上清を細胞抽出液 (CFE) として回収した。CFE 中のタンパク質濃度は、Protein Quantification Kit-Rapid (同仁化学研究所) を用いて定量した。

BGL 分解活性は、BGL 分解により生じる還元糖を 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 法<sup>7)</sup>で定量し、評価した。30  $\mu$ L の反応液 (1 mg/mL CFE, 0.5% BGL in 20 mM KPB, pH 6.5) を 37°C, 600 rpm で 30 分インキュベート後、90  $\mu$ L の DNS 試薬を添加し反応を停止した。100°Cで 5 分間インキュベート後、蒸留水で 2 倍希釈し、A<sub>570</sub> を測定した。既知濃度のグルコースを用いて検量線を作成し、反応液中の還元糖量をグルコース換算値として算出した。BGL 以外の基質に対する分解活性を評価する際についても同様に行った。

### RNA-seq 解析

*S. copri* JCM13464<sup>T</sup> を 0.1% グルコースあるいは 0.1% BGL 添加糖分解測定用 GAM で対数増殖期まで培養後、菌体を回収した。回収した菌体は、RNAlater で懸濁し、RNA 精製まで 4°Cで保存した。RNA 精製は橋本らの方法に従った<sup>8)</sup>。Nanodrop および Qubit を用いて精製 RNA の濃度ならび A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> を測定した。RNA integrity number (RIN) の測定により精製 RNA の分解度を評価した。RIN 測定、rRNA 除去および DNBSEQ-G400RS を用いた RNA-seq 解析は、ゲノムリード株式会社に依頼した。得られたシーケンス結果は Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>) を用いて解析した。

### *S. copri* の遺伝子破壊株の作出

*S. copri* の遺伝子破壊は、Li らの方法<sup>9)</sup>に従って行った。pEx-deletion-erm は、Addgene より購入した。*Escherichia coli* JM109  $\lambda$ pir および  $\beta$ 2155 株は、それぞれ国立遺伝学研究所ならびに German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH から購入した。標的遺伝子領域の上流と下流それぞれ 2,000 bp を連結した断片を pEx-deletion-erm にクローニングした。*E. coli*  $\beta$ 2155 をドナー株として、接合により *S. copri* にプラスミドを導入し、2 回相同組換えにより欠損株を作出した。遺伝子欠損株について相同組換えに用いた標的遺伝子の上流と下流それぞれ 2,000 bp について変異がないことをシーケンス解析により確認した。

### 糖資化能評価

*S. copri* の糖資化能は、種々の糖を終濃度 0.1%となるよう添加した半合成培地での生育能から評価した。本研究では、ポリアミン削減培地<sup>10)</sup>を基に GAM に換えて糖分解測定用

GAM を使用して基礎培地を調製し、種々の糖を終濃度 0.1% となるよう添加し、本培養培地とした。GAM で 24 時間前培養した菌体を糖無添加の半合成培地で懸濁し、本培養培地に  $OD_{600} = 0.03$  となるよう植菌した。37℃、嫌気条件下で 24 時間培養後、 $OD_{600}$  を測定した。

## 統計処理

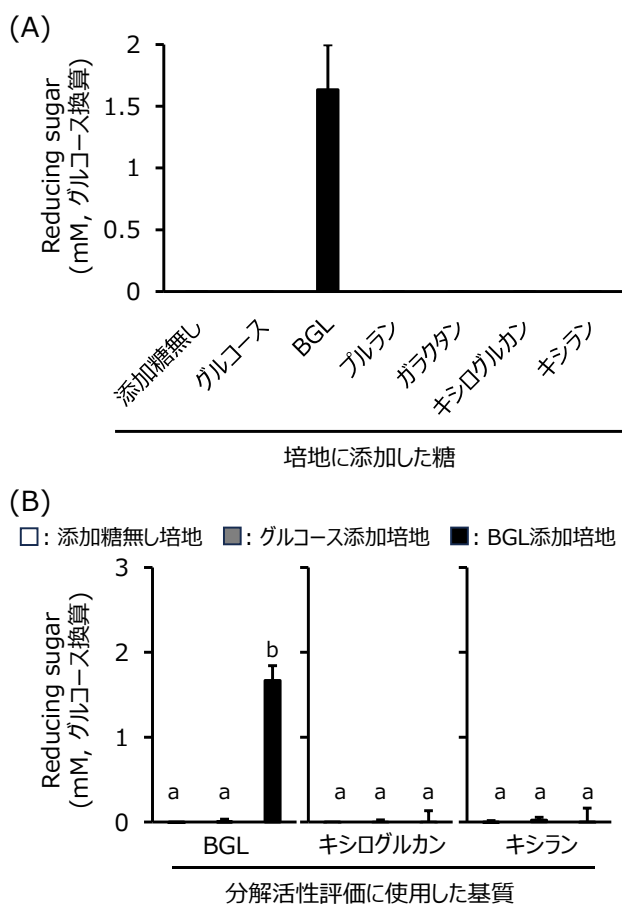
統計処理は、SPSS statistics version 28 (IBM) を用いて行った。データは、平均±標準偏差で示した。

## 【実験結果と考察】

### 1. 培地中の BGL による BGL 分解活性の誘導

*S. copri* を種々の食物繊維ならびにグルコースを添加した培地で培養後、菌体からタンパク質を抽出し、BGL 分解活性を評価した。この結果、BGL 分解活性は、培地中の BGL によって誘導されることが明らかとなった (Figure 1A)。

さらに、BGL 以外の食物繊維分解活性に対する培地中 BGL の影響を評価した。この結果、培地への BGL 添加によるキシログルカンおよびキシランに対する分解活性の誘導は見られなかった (Figure 1B)。以上の結果より、*S. copri* JCM 13464<sup>T</sup> において、培地中に存在する BGL の分解・資化に寄与する遺伝子の発現は、厳密に制御されていることが示唆された。



**Figure 1. *S. copri* JCM 13464<sup>T</sup> の BGL 分解活性**

(A) 種々の糖による BGL 分解活性誘導

種々の糖を添加した培地で *S. copri* を培養後、菌体から抽出したタンパク質を使用し、BGL 分解活性を評価した。

(B) BGL による他の食物繊維分解活性誘導

種々の糖を添加した培地で *S. copri* を培養後、菌体から抽出したタンパク質を使用し、BGL、キシログルカンおよびキシラン分解活性を評価した。

## 2. RNA-seq を用いた BGL 分解・資化に關与する遺伝子の探索

BGL 添加によって発現量が変化する遺伝子を RNA-seq を用いて探索した。この結果、グルコースと比較して BGL 添加によって発現量が  $2^7 \sim 2^8$  倍増加する遺伝子群を同定した (Figure 2)。

当該遺伝子領域は 6 つ遺伝子から構成される Polysaccharide utilization loci (PUL) と予想された。

PUL は、多糖の利用に寄与する遺伝子領域であり、多糖分子ごとに対応する PUL が異なる。RNA-seq により BGL 資化への寄与が予想された当該 PUL の解析はこれまで行われておらず、機能は不明であった。そこで、当該遺伝子群の欠損株を作出 (Figure 3A) し、BGL 資化能を評価した。この結果、当該遺伝子群を欠損することで、BGL の資化能が消失した一方で、BGL 以外の食物繊維の資化能は変化しなかった (Figure 3B)。以上より当該遺伝子領域が *S. copri* JCM 13464<sup>T</sup> において、BGL 資化に必須であることが明らかとなった。加えて、大麦以外の

の  $\beta$ -グルカン資化への寄与を評価した結果、地衣類に含まれるリケナンの資化にも必須であることが分かった。一方、海藻に含まれるラミナリンは、野生株が資化能を示さなかった (Figure 3C)。いずれもグルコースを構成糖とするが、BGL とリケナンは、 $\beta 1-3$  と  $\beta 1-4$  結合から成る一方、ラミナリンは  $\beta 1-3$  結合のほか  $\beta 1-6$  結合による分岐鎖を持つ。 $\beta 1-6$  結合による分岐鎖構造が、

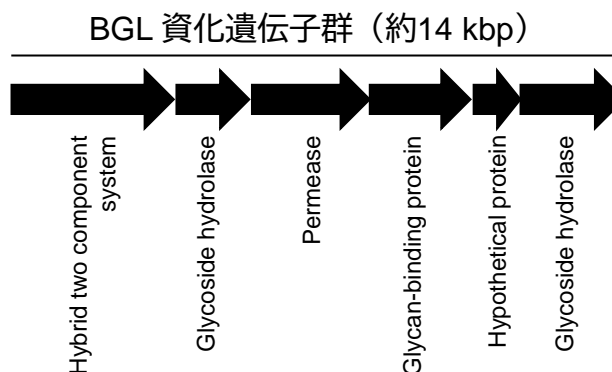


Figure 2. BGL によって発現が亢進した遺伝子領域

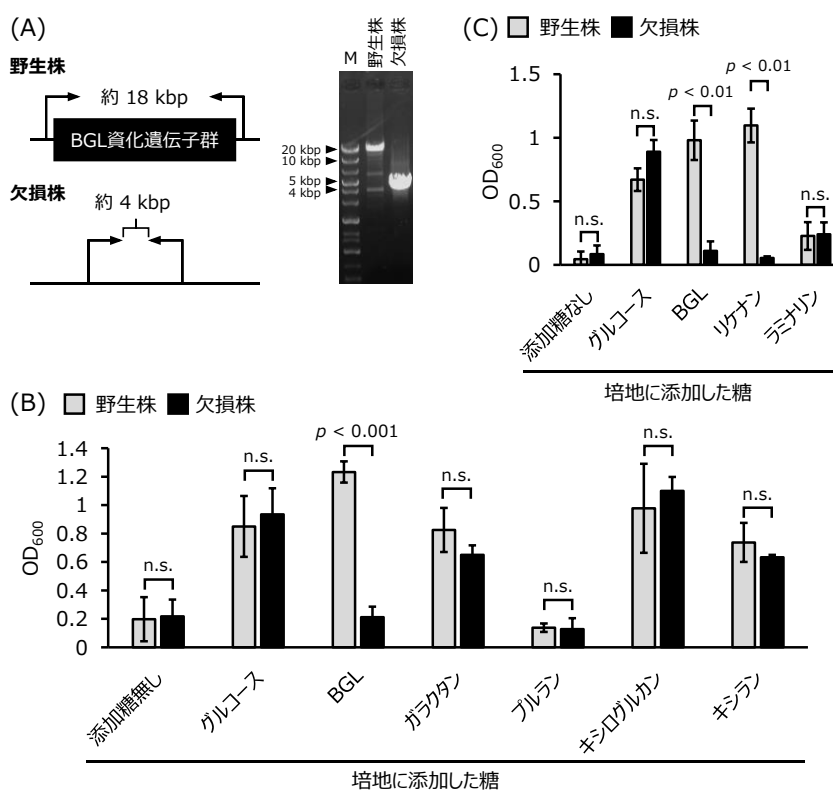


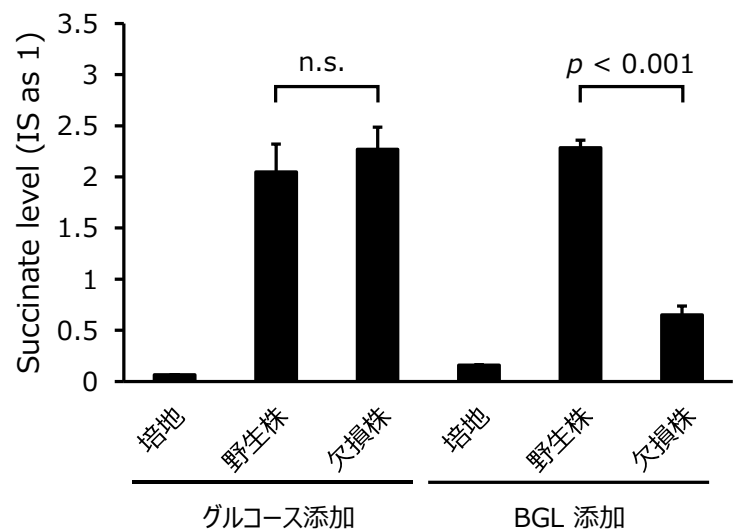
Figure 3. BGL 資化遺伝子群欠損株の作出と糖質資化能評価

(A) BGL 資化遺伝子群欠損株の genotyping  
(B) 食物繊維添加半合成培地での生育能評価  
(C) BGL 以外の  $\beta$ -グルカン資化への寄与  
n.s., not significant

主鎖の分解を阻害している可能性が示唆された。本研究により、BGL 資化に必須の遺伝子群を同定することが出来たが、同遺伝子群を構成する各タンパク質の機能は未解明であり、詳細な BGL 分解・資化機構を示すためには、組換えタンパク質および各遺伝子の欠損株を用いた解析が必須である。さらに、BGL 資化遺伝子群の発現誘導に必要な  $\beta$ -グルカンの鎖長など、BGL 資化遺伝子群の発現制御機構についてもさらなる解析が必要である。将来、BGL 資化遺伝子群に含まれる各タンパク質について、組換えタンパク質調製および欠損株を用いたより詳細な解析を行うとともに、発現制御機構の解明を行う予定である。上述の通り、*S. copri* は株ごとに糖質資化能が異なるが、種々の株における BGL 資化遺伝子群の保存性が BGL 資化能に対応するかの解明も今後進めていく。

### 3. *S. copri* が産生する代謝物の解析

*S. copri* が BGL 資化によって産生する代謝物の同定を試みた。グルコースあるいは BGL を含む半合成培地で培養した培養上清について、一次代謝物に関するメタボローム解析を行った。しかし、BGL 特異的に増加する代謝物を同定することはできなかった。一方で、野生株と BGL 資化遺伝子群欠損株について BGL 含有半合成培地での培養上清中の代謝物を比較した結果、コハク酸レベルに



**Figure 4. 培養上清中のコハク酸レベル**  
内部標準 (IS) に対するピーク面積相対値を示した。  
n.s., not significant

有意な差が見られ、一方、グルコース添加培地においては BGL 資化遺伝子群の有無によるコハク酸レベルに有意差は見られなかった (Figure 4)。腸内細菌が産生したコハク酸が、耐糖能やインスリン耐性の改善に寄与することが報告<sup>11)</sup>され、*S. copri* を介した BGL による血糖値上昇抑制作用の実行分子であることが示唆されている<sup>5)</sup>。本研究により、BGL 資化遺伝子群を介した BGL 資化が BGL 添加培地でのコハク酸生成に重要であることが示された。

### 【要約】

本研究では、BGL のレスポンドの腸内に多く、BGL の保健効果を担うヒト腸内細菌の 1 種である *S. copri* の BGL 分解・資化機構の解明を試みた。*S. copri* JCM 13464<sup>T</sup> において、BGL 分解活性が培地中の BGL により誘導されることを明らかにした。さらに、BGL によ

り誘導される多糖分解活性は、BGL 特異的であることが示唆された。RNA-seq を用いて BGL 存在下で発現量が増加する遺伝子を網羅的に探索し、BGL 分解・資化に関与する遺伝子群を推定した。次いで、当該遺伝子群の欠損株を作出し、推定した遺伝子群が BGL の資化に必須であることを明らかにした。同定した BGL 資化遺伝子群は、BGL を含む  $\beta$ -1,3-1,4-グルカンの資化に必須であり、他の他の食物繊維の資化には寄与しないことが強く示唆された。BGL 存在下で特異的に増加する代謝物の同定には至らなかったが、BGL 資化遺伝子群が BGL 存在下でのコハク酸生成に重要であることを示した。本研究で同定した BGL 資化遺伝子群は、BGL の保健効果予測に有用な遺伝子マーカーになることが期待される。

## 【謝辞】

本研究の遂行をご支援頂いた公益財団法人 タカノ農芸化学研究助成財団に心から御礼申し上げます。本研究の遂行にご尽力頂いた群馬大学大学院医学系研究科 大山 ももこ氏に感謝いたします。RNA-seq 解析において大変丁寧な御指導頂いた群馬大学大学院医学研究科 細菌学講座 橋本 佑輔 先生ならびに富田 治芳 先生に御礼申し上げます。メタボローム解析についてご支援頂いた群馬大学大学院医学系研究科 共同利用機器部門 大日方 英 先生ならびに相良 陽子氏に感謝申し上げます。

## 【文献】

1. Kassem Makki *et al.* (2018) The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease  
*Cell Host Microbe*. 23(6):705-715
2. Sofia M Murga-Garrido *et al.* (2021) Gut microbiome variation modulates the effects of dietary fiber on host metabolism. *Microbiome*. 9(1):117
3. Stephen Nayfach *et al.* (2019) New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome. *Nature*. 568(7753):505-510
4. Ron Sender *et al.* (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*. 14(8):e1002533
5. Petia Kovatcheva-Datchary *et al.* (2015) Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metabolism*. 22(6):971-82
6. Hannah Fehlner-Peach *et al.* (2019) Distinct Polysaccharide Utilization Profiles of Human Intestinal *Prevotella copri* Isolates. *Cell Host Microbe*. 26(5):680-690
7. Gail Lorenz Miller. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of

Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3):426-428

8. Yusuke Hashimoto *et al.* (2023) Enterococcal Linear Plasmids Adapt to *Enterococcus faecium* and Spread within Multidrug-Resistant Clades. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 67(4):e0161922
9. Jing Li *et al.* (2021) A versatile genetic toolbox for *Prevotella copri* enables studying polysaccharide utilization systems. *EMBO Journal*. 40(23):e108287
10. Mikiyasu Sakanaka *et al.* (2016) Carboxyspermidine decarboxylase of the prominent intestinal microbiota species *Bacteroides thetaiotaomicron* is required for spermidine biosynthesis and contributes to normal growth. *Amino Acids*. 48(10):2443-51
11. Filipe De Vadder *et al.* (2016) Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metabolism*. 24(1):151-7