

乳児腸内フローラの形成に影響するビフィズス菌鍵因子の 解明

誌名	ミルクサイエンス = Milk science
ISSN	13430289
著者名	松本,星隆 松木,隆広
発行元	日本酪農科学会
巻/号	66巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 255-260
発行年月	2017年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



乳児腸内フローラの形成に影響するビフィズス菌鍵因子の解明

松本星隆*・松木隆広

(株式会社ヤクルト本社 中央研究所, 東京都国立市泉 5-11, 186-8650)

Bifidobacterial key genetic factors for development of infant gut microbiota and environment

Hoshitaka Matsumoto* and Takahiro Matsuki

(Yakult Central Institute, 5-11 Izumi, Kunitachi-shi, Tokyo, 186-8650 Japan)

1. はじめに

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。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に関連している。近年、次世代シーケンサーを活用した腸内フローラ解析技術の進展もあり、フローラ研究は急速な拡大を見せている。これに伴って、宿主に影響を及ぼす特定の細菌や遺伝子、さらには、その作用機序に関する知見も得られつつある。乳児期の腸内フローラ構成は、乳児の健康のみにとどまらず、その生涯にわたって宿主の生理に影響を及ぼすことが示唆されており¹⁻⁴⁾、その重要性がより一層認識されることとなった。本稿では、誕生直後のヒト乳児における腸内フローラ形成過程とその腸内環境への影響、および、多くの乳児で最優勢となるビフィズス菌と宿主との共生関係構築に重要となる因子について、筆者らの研究例を中心に紹介する。

2. 乳児腸内フローラの特徴とその形成過程

乳児の腸内フローラは誕生直後に形成が始まり、その構成は短期間のうちに大きく変化する⁵⁾。また、成人とは大きく異なるフローラ構成を示し、多くの乳児ではビフィズス菌優勢なフローラが形成される⁶⁻¹¹⁾。筆者らは、正常分娩で誕生した日本人の母乳栄養児12名における生後1か月間の腸内フローラ形成過程を、16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域の配列情報に基づいて解析

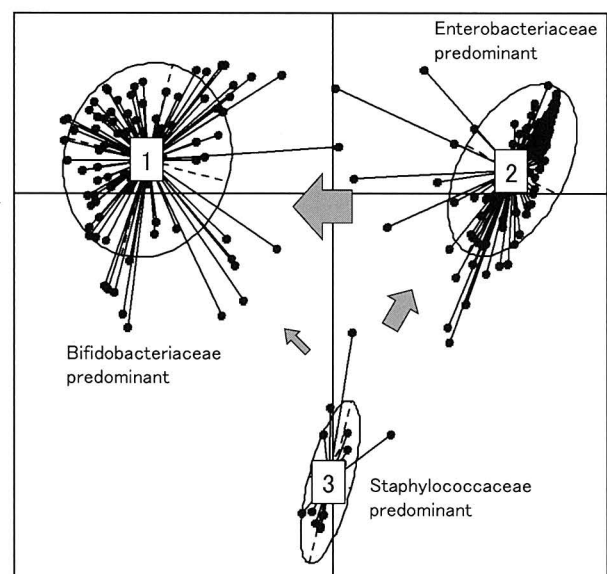


図1 生後1か月間のフローラ構成タイプとその遷移
母乳栄養児12名の生後1か月間の便サンプル（計202サンプル）について、科レベルでのフローラ構成類似度（Jensen-Shannon divergence）に基づき、Partitioning around medoids アルゴリズムによるクラスタリングを行った。図中の●は各サンプルを表し、Jensen-Shannon divergenceを用いた主座標分析結果に基づいてプロットした。灰色矢印はフローラ構成タイプの経時的な遷移方向を表す。文献¹²⁾から引用し、一部改変した。

し、そのフローラ構成が Bifidobacteriaceae（ビフィズス菌科）、Enterobacteriaceae（腸内細菌科）、Staphylococcaceae（ブドウ球菌科）のいずれかが優勢となる3つのタイプに分類できることを見出した（図1）。また、生後日数の経過に伴って Staphylococcaceae あるいは Enterobacteriaceae が優勢なフローラ構成から、Bifidobacteriaceae が優勢なフローラ構成への不可逆的な遷移が認められ、その時期は乳児ごとに異なっていた¹²⁾。

このようなフローラ構成タイプの分類は、いわゆる

* 連絡者：松本星隆（まつもと ほしたか）
〒186-8650 東京都国立市泉 5-11
株式会社ヤクルト本社 中央研究所
(Tel : 042-577-8960, Fax : 042-577-3020,
E-mail : hoshitaka-matsumoto@yakult.co.jp)
2017年10月18日 受理
[doi:10.11465/milk.66.255]

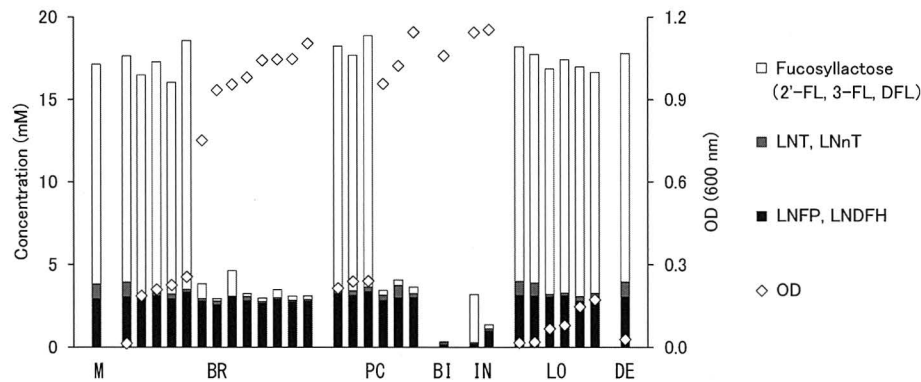


図2 ビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖資化性の比較

乳児から分離したビフィズス菌29株について、ヒトミルクオリゴ糖を唯一の炭素源として培養し、培養40時間後の濁度(600 nmのOD値)と上清中の残存オリゴ糖濃度を測定した。M, 培地のみ; BR, *B. breve*; PC, *B. pseudocatenulatum*; BI, *B. bifidum*; IN, *B. longum* subsp. *infantis*; LO, *B. longum* subsp. *longum*; DE, *B. dentium*; FL, フコシルラクトース; DFL, ジフコシルラクトース; LNT, ラクト-N-テトラオース; LNnT, ラクト-N-ネオテトラオース; LNFP, ラクト-N-フコペンタオース; LNDFH, ラクト-N-ジフコヘキサオース。文献¹²⁾から引用し、一部改変した。

「エンテロタイプ」として2011年に Arumugam らによって提唱され、成人において3つのタイプ (*Bacteroides* 優勢, *Prevotella* 優勢, *Ruminococcus* 優勢) が報告されている¹³⁾。また中山らは、アジアの小児において2つのフローラ構成タイプ (*Bifidobacterium* および *Bacteroides* 優勢, *Prevotella* 優勢) が見られることを報告している¹⁴⁾。乳児で見出された3つのフローラ構成タイプは、これまでに報告されているものとはいずれも異なり、乳児に特有のものであると考えられる。

3. フローラ構成の違いが乳児腸内環境に与える影響

(1) ビフィズス菌の定着と腸内環境

正常分娩で誕生した日本人の母乳栄養児27名(先の12名の乳児を含む)の生後1か月目の腸内フローラ構成を調べたところ、19名で *Bifidobacteriaceae* の定着が見られ、ほとんどの乳児で最優勢を占めていた。一方、8名では *Bifidobacteriaceae* の定着が認められず、*Bifidobacterium dentium* のみが定着した1名を含め、主に *Enterobacteriaceae* が優勢なフローラが形成されていた¹²⁾。*Bifidobacteriaceae* 占有率と便中の酢酸濃度は正の相関 ($\rho=0.47$) を示し、同占有率と便のpH、および便中に残存したヒトミルクオリゴ糖濃度は、それぞれ負の相関 ($\rho=-0.53$, および $\rho=-0.56$) を示した。この結果は、乳児腸内でビフィズス菌がヒトミルクオリゴ糖を代謝して酢酸を産生し、それによりpHの低下が引き起こされることを示唆するものと考えられた。しかし、*Bifidobacteriaceae* が最優勢を占めている乳児でも、ヒトミルクオリゴ糖が高濃度で便中に残存している例が認められた¹²⁾。

(2) ビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖資化性

ヒトミルクオリゴ糖は、2'-フコシルラクトース、ラクト-N-フコペンタオースI、ラクト-N-ジフコヘキサオースI、ラクト-N-テトラオースなどを主要とした130種類以上もの成分から構成されており¹⁵⁾、各オリゴ糖の資化性は菌種によって異なることが報告されている^{16~18)}。そのため、*Bifidobacteriaceae* 優勢の乳児間で見られたヒトミルクオリゴ糖の便中残存量の差異は、定着したビフィズス菌種の違いに起因していると予測された。しかし、定着菌種とヒトミルクオリゴ糖の残存量との間に明確な関連性は認められなかった¹²⁾。そこで、乳児便から計29株のビフィズス菌を分離し、そのヒトミルクオリゴ糖資化性を詳細に調べた。ヒトミルクオリゴ糖の主要成分の1つであるフコシルラクトース(2'-フコシルラクトース, 3-フコシルラクトース, ジフコシルラクトース)を効率よく資化できた菌種は *B. breve*, *B. pseudocatenulatum*, *B. bifidum*, *B. longum* subsp. *infantis* であったが、このうち *B. breve* および *B. pseudocatenulatum* では、菌株によってその資化性が異なっていた(図2)。

(3) 乳児の腸内環境に影響を与えるビフィズス菌の形質

前述した生後1か月目の乳児27名を、フコシルラクトース資化性ビフィズス菌が定着した *Bifidobacteriaceae* 優勢フローラの乳児(B1群, n=11)、フコシルラクトース資化性ビフィズス菌が定着しなかった *Bifidobacteriaceae* 優勢フローラの乳児(B2群, n=7)、*Enterobacteriaceae* 優勢フローラの乳児(E群, n=9)の3群に分け、その腸内環境を比較した。同じ *Bifidobacteriaceae* 優勢フローラの乳児でも、B1群の乳児では、*Bifidobacteriaceae* 占有率および酢酸濃度がB2群の乳

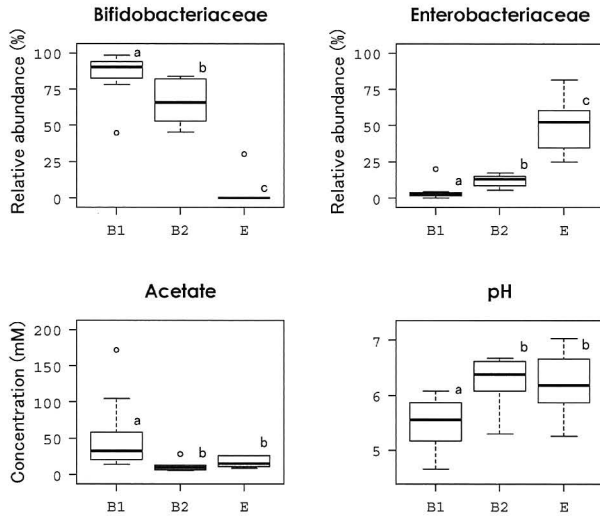


図3 フコシルラクトース資化性ビフィズス菌の定着と乳児腸内環境
 生後1か月の乳児27名をフローラ構成に基づいて3群にわけ、その腸内環境を比較した。各箱ひげ図の右肩部に示したアルファベットは、異なる文字間で統計的有意差があることを表す ($p < 0.05$, Mann-Whitney U testの結果を Bonferroni 法により補正)。B1, フコシルラクトース資化性ビフィズス菌が定着した Bifidobacteriaceae 優勢フローラの乳児 (n = 11); B2, フコシルラクトース資化性ビフィズス菌が定着しなかった Bifidobacteriaceae 優勢フローラの乳児 (n = 7); E, Enterobacteriaceae 優勢フローラの乳児 (n = 9)。文献¹²⁾から引用し、一部改変した。

児より高く、pHはより低い値を示した(図3)。また、B2群の乳児とE群の乳児の間では、酢酸濃度やpHに明確な差が認められなかった。腸内における酢酸の産生は、感染防御^{19,20)}やエネルギー恒常性の維持^{21,22)}、交感神経系の発達²³⁾、抗炎症作用²⁴⁾などの観点から、宿主に対して有益な作用をもたらすことが報告されている。すなわち、ビフィズス菌のフコシルラクトース資化性は、母乳栄養児の腸内環境やその生理に対して非常に大きな影響を及ぼす形質であることが明らかとなった。

4. ビフィズス菌のフコシルラクトース資化性を規定する遺伝子

(1) フコシダーゼ遺伝子

フコシルラクトースの代謝においては、糖質加水分解酵素であるフコシダーゼが重要な役割を果たす。フコシダーゼには、糖質加水分解酵素ファミリー GH29 に分類される α -1,3/4-L-フコシダーゼと、同 GH95 に分類される α -1,2-L-フコシダーゼが見出されている^{25,26)}。ビフィズス菌におけるフコシルラクトース資化性の規定因子を同定するため、まず、フコシダーゼ遺伝子の有無に着目した。先にヒトミルクオリゴ糖資化性を調べたビ

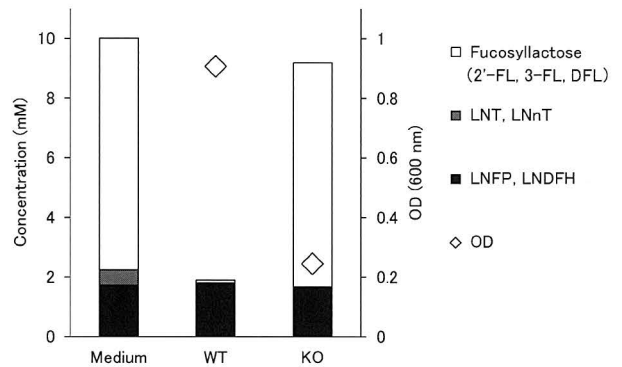


図4 ABC 輸送体遺伝子破壊株のヒトミルクオリゴ糖資化性
 ヒトミルクオリゴ糖を唯一の炭素源として培養し、培養40時間後の濁度(600 nmのOD値)と上清中の残存オリゴ糖濃度を測定した。WT, 野生株; KO, ABC 輸送体基質結合タンパク質遺伝子破壊株; FL, フコシルラクトース; DFL, ジフコシルラクトース; LNT, ラクト-N-テトラオース; LNnT, ラクト-N-ネオテトラオース; LNFP, ラクト-N-フコペンタオース; LNDFH, ラクト-N-ジフコヘキサオース。文献¹²⁾から引用し、一部改変した。

フィズス菌29株の比較ゲノム解析の結果、フコシルラクトース資化性を示した菌株はすべてフコシダーゼ遺伝子を有しており、*B. bifidum* と *B. longum* subsp. *infantis* からは GH29 と GH95 の両方が、*B. breve* と *B. pseudocatenulatum* からは GH95 のみが見出された¹²⁾。しかし、資化性を示さない菌株の一部でもフコシダーゼ遺伝子が見出され、これらの株のフコシダーゼ遺伝子およびその上流部の塩基配列に変異は生じていなかった。したがって、当該遺伝子の有無のみでは資化性の違いを説明付けることができなかった。

(2) ABC 輸送体遺伝子

フコシダーゼ遺伝子以外にもビフィズス菌のフコシルラクトース資化性を規定する遺伝子が存在するのではないかと考え、資化性菌株のみが共通して保有する遺伝子を探索したところ、ATP 結合カセット輸送体(ABC 輸送体)を構成する遺伝子セットが唯一の候補として見出された。当該 ABC 輸送体の基質は当初未知であったが、本遺伝子の破壊株ではフコシルラクトース資化性が消失したことから、当該 ABC 輸送体がフコシルラクトースの輸送体であることが明らかとなった(図4)。なお、*B. bifidum* ではフコシルラクトース輸送体が見出されなかったが、本菌種が菌体外型のフコシダーゼを有しており^{25,26)}、フコシルラクトースを取り込む必要がないことを鑑みるとなんら矛盾はない。したがって、新たに見出されたフコシルラクトース輸送体とフコシダーゼが、ビフィズス菌のフコシルラクトース資化性を規定す

る遺伝子であることが明らかとなった。

5. おわりに

本稿では、誕生後1か月間の母乳栄養児の腸内フローラが、StaphylococcaceaeあるいはEnterobacteriaceaeが優勢なフローラ構成からBifidobacteriaceaeが優勢なフローラ構成へと遷移していくこと、また、ビフィズス菌の中でもフコシルラクトース資化性ビフィズス菌の定着が、乳児の腸内環境に対して大きな影響を与えることを紹介した。とくに腸内の酢酸濃度の上昇は、宿主にとって有益な変化であることが多数報告されている。すなわち、ビフィズス菌のフコシルラクトース資化性を規定するフコシダーゼ遺伝子とフコシルラクトース輸送体遺伝子、そして母乳中のフコシルラクトースは、乳児/ビフィズス菌間の共生関係の構築における鍵因子であるといえる。

また、乳児/ビフィズス菌間の共生関係構築という観点において、各種オリゴ糖をはじめとしたプレバイオティクスの役割も忘れてはならない。ガラクトオリゴ糖やフルクトオリゴ糖の投与は、乳児腸内のビフィズス菌占有率や酢酸濃度の上昇をもたらすことが報告されている^{27~30}。既に紹介したように、フコシルラクトース資化性を示さないビフィズス菌のみが定着した乳児は、フローラ構成におけるビフィズス菌の占有率が比較的低く、顕著な酢酸濃度の上昇は見られなかった。このような乳児や、しばしば母乳栄養児よりもビフィズス菌占有率が低いとされる人工栄養児に対して、プレバイオティクスが果たす役割は大きいと考える。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究内容は、ヤクルト本社中央研究所と東京工業大学との共同研究により得られた成果です。東京工業大学・黒川顕教授（現 国立遺伝学研究所）、東京工業大学・山田拓司准教授、東京工業大学・森宙史助教（現 国立遺伝学研究所）、ヤクルト本社中央研究所・矢矧加奈氏をはじめとした共同研究者の皆様に深く感謝いたします。また、試験サンプルを提供していただいたボランティアの皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1) Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L., Forssberg, H. and Pettersson, S.: Normal gut microbiota modulates brain development and

behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 3047–3052 (2011).

- 2) Cho, I., Yamanishi, S., Cox, L., Methé, B. A., Zavadil, J., Li, K., Gao, Z., Mahana, D., Raju, K., Teitler, I., Li, H., Alekseyenko, A. V. and Blaser, M. J.: Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*, **488**, 621–626 (2012).
- 3) Cox, L. M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A. V., Leung, J. M., Cho, I., Kim, S. G., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., Zárata Rodriguez, J. G., Rogers, A. B., Robine, N., Loke, P. and Blaser M. J.: Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell*, **158**, 705–721 (2014).
- 4) Kostic, A. D., Gevers, D., Siljander, H., Vatanen, T., Hyötyläinen, T., Hämäläinen A. M., Peet, A., Tillmann, V., Pöhö, P., Mattila, I., Lähdesmäki, H., Franzosa, E. A., Vaarala, O., de Goffau, M., Harmsen, H., Ilonen, J., Virtanen, S. M., Clish, C. B., Orešič, M., Huttenhower, C., Knip, M.; DIABIMMUNE Study Group and Xavier, R. J.: The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe*, **17**, 260–273 (2015).
- 5) Mitsuoka, T.: Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci. Microbiota Food Health*, **33**, 99–116 (2014).
- 6) Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V. K., Srivastava, T. P., Taylor, T. D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D. S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi and T., Hattori, M.: Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.*, **14**, 169–181 (2007).
- 7) Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R. and Gordon, J. I.: Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, **486**, 222–227 (2012).
- 8) Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T. and Ley, R. E.: Succession of microbial consortia in

- the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108** (Suppl 1), 4578–4585 (2011).
- 9) Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P. A. and Stobberingh, E. E.: Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, **118**, 511–521 (2006).
 - 10) Backhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., Tremaroli, V., Yin, Y., Bergman, S., Xu, X., Madsen, L., Kristiansen, K., Dahlgren, J. and Wang, J.: Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*, **17**, 690–703 (2015).
 - 11) Tsuji, H., Oozeer, R., Matsuda, K., Matsuki, T., Ohta, T., Nomoto, K., Tanaka, R., Kawashima, M., Kawashima, K., Nagata, S. and Yamashiro, Y.: Molecular monitoring of the development of intestinal microbiota in Japanese infants. *Benef. Microbes*, **3**, 113–125 (2012).
 - 12) Matsuki, T., Yahagi, K., Mori, H., Matsumoto, H., Hara, T., Tajima, S., Ogawa, E., Kodama, H., Yamamoto, K., Yamada, T., Matsumoto, S. and Kurokawa, K.: A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. *Nat. Commun.*, **7**, 11939 (2016).
 - 13) Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Doré, J.; MetaHIT Consortium, Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H. M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K. U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Mérieux, A., Melo Minardi, R., M’rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Bork, P.: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, **473**, 174–180 (2011).
 - 14) Nakayama, J., Watanabe, K., Jiang, J., Matsuda, K., Chao, S. H., Haryono, P., La-Ongkham, O., Sarwoko, M. A., Sujaya, I. N., Zhao, L., Chen, K. T., Chen, Y. P., Chiu, H. H., Hidaka, T., Huang, N. X., Kiyohara, C., Kurakawa, T., Sakamoto, N., Sonomoto, K., Tashiro, K., Tsuji, H., Chen, M. J., Leelavatcharamas, V., Liao, C. C., Nitisinprasert, S., Rahayu, E. S., Ren, F. Z., Tsai, Y. C. and Lee, Y. K.: Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci. Rep.*, **5**, 8397 (2015).
 - 15) 浦島 匡・朝隈貞樹・福田健二：ヒトミルクオリゴ糖の生理作用. *ミルクサイエンス*, **56**, 155–176 (2008).
 - 16) Ward, R. E., Niñonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B. and German, J. B.: In vitro fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.*, **51**, 1398–1405 (2007).
 - 17) Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Ashida, H., Hirose, J. and Kitaoka, M.: Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *J. Biol. Chem.*, **286**, 34583–34592 (2011).
 - 18) 片山高嶺：ピフィズス菌とヒトミルクオリゴ糖. *応用糖質科学*, **4**, 287–294 (2014).
 - 19) Asahara, T., Shimizu, K., Nomoto, K., Hamabata, T., Ozawa, A. and Takeda, Y.: Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 : H7. *Infect. Immun.*, **72**, 2240–2247 (2004).
 - 20) Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M. and Ohno, H.: Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, **469**, 543–547 (2011).
 - 21) Samuel, B. S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F. E., Backhed, F., Manchester, J. K., Hammer, R. E.,

- Williams, S. C., Crowley, J., Yanagisawa and M., Gordon, J. I.: 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**, 16767–16772 (2008).
- 22) Kimura, I., Ozawa, K., Inoue, D., Imamura, T., Kimura, K., Maeda, T., Terasawa, K., Kashihara, D., Hirano, K., Tani, T., Takahashi, T., Miyauchi, S., Shioi, G., Inoue and H., Tsujimoto, G.: The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat. Commun.*, **4**, 1829 (2013).
- 23) Kimura, I., Inoue, D., Maeda, T., Hara, T., Ichimura, A., Miyauchi, S., Kobayashi, M., Hirasawa, A. and Tsujimoto, G.: Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 8030–8035 (2011).
- 24) Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H. C., Rolph, M. S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R. J., Teixeira, M. M. and Mackay, C. R.: Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, **461**, 1282–1286 (2009).
- 25) Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T., Makimura, Y., Hiratake, J., Sakata, K., Yamanoi, T., Kumagai, H. and Yamamoto, K.: Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). *J. Bacteriol.*, **186**, 4885–4893 (2004).
- 26) Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H., Katayama, T. and Yamamoto, K.: Two distinct α -L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology*, **19**, 1010–1017 (2009).
- 27) Moro, G., Minoli, I., Mosca, M., Fanaro, S., Jelinek, J., Stahl, B. and Boehm, G.: Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **34**, 291–295 (2002).
- 28) Knol, J., Scholtens, P., Kafka, C., Steenbakkers, J., Gro, S., Helm, K., Klarczyk, M., Schopfer, H., Bockler, H. M. and Wells, J.: Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructooligosaccharides: more like breast-fed infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **40**, 36–42 (2005).
- 29) Ben, X. M., Li, J., Feng, Z. T., Shi, S. Y., Lu, Y. D., Chen, R. and Zhou, X. Y.: Low level of galacto-oligosaccharide in infant formula stimulates growth of intestinal bifidobacteria and lactobacilli. *World J. Gastroenterol.*, **14**, 6564–6568 (2008).
- 30) Matsuki, T., Tajima, S., Hara, T., Yahagi, K., Ogawa, E. and Kodama, H.: Infant formula with galacto-oligosaccharides (OM55N) stimulates the growth of indigenous bifidobacteria in healthy term infants. *Benef. Microbes*, **7**, 453–461 (2016).