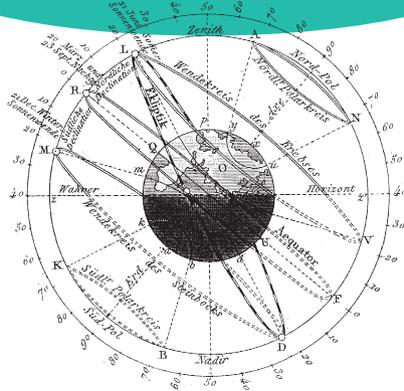


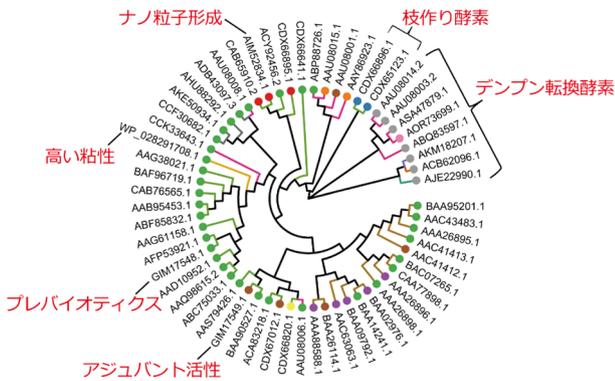
# 【解説】



【2022年農芸化学女性研究者賞】

## 乳酸菌の産生する菌体外多糖の機能性とその応用 食品・医薬産業へ利用可能な機能性

吉田健太郎\*<sup>1</sup>，小柳 喬\*<sup>1</sup>，松崎千秋\*<sup>2</sup>



その長い食経験ゆえ、安全性が高いことが知られている。そのため安全性の担保されたこの乳酸菌が産生する菌体外多糖は汎用性が高く、様々な産業分野への利用が期待できる。またその多糖の構造は菌株レベルで異なるため、現状でも様々な機能性が報告されており、さらに新たな機能が潜在している可能性も高い。本稿では乳酸菌の菌体外多糖の機能性を利用するために有用と思われる知見を、他の微生物由来の菌体外多糖と比較しながら紹介したい。

### 菌体外多糖の物理化学的特性とその応用

菌体外多糖の中でも単一の糖を構成糖とするホモ多糖体は菌からの産生量が多く<sup>(1)</sup>、物理化学的特性に基づいた産業利用が期待される。ホモ多糖体はD-グルコースから成る $\alpha$ -グルカンや $\beta$ -グルカンおよびD-フルクトースから成る $\beta$ -フラクタン<sup>(2)</sup>の3つのタイプに大別される。 $\alpha$ -グルカンは *Leuconostoc* 属、*Weissella* 属および *Streptococcus* 属の細菌、 $\beta$ -フラクタンは *Bacillus* 属、*Streptococcus* 属、*Leuconostoc* 属および *Lactobacillus* 属 (ただし旧分類上の *Lactobacillus* 属) の細菌が主に産生する<sup>(2-5)</sup>。これらの多糖は菌体外に分泌される酵素によりスクロースを基質として菌体外で合成される。一方、 $\beta$ -グルカンは *Agro-*

キーワード：菌体外多糖，乳酸菌，物理化学的特性，保健効果，多糖合成酵素

細菌が多糖類（菌体外多糖）を産生している理由としては主に、細菌の凝集や接着，そして環境ストレスに対する菌体防御のためと考えられている。これら菌体外多糖を産生する細菌の中でも乳酸菌は古来より食品の発酵に利用されており、

Industrial Application of Lactic Acid Bacteria-Derived Exopolysaccharides: Future Potential for Application in the Pharmaceutical and Functional Food Industries  
Kentaro YOSHIDA, Takashi KOYANAGI, Chiaki MATSUZAKI.  
\*<sup>1</sup>石川県立大学食品科学科，\*<sup>2</sup>石川県立大学生物資源工学研究所

*bacterium* 属および *Gluconacetobacter* 属など幅広い細菌が産生する<sup>(6, 7)</sup>。多くの場合、菌体内でのUDP-グルコースを基質とした重合反応ののちに分泌経路を介して菌体外に分泌される。

## 1. $\alpha$ -グルカン合成酵素

乳酸菌が産生するホモ多糖体のうち最も一般的なグルカンである $\alpha$ -グルカンは、直鎖デキストラン ( $\alpha$ -1,6グリコシド結合を主鎖とする)、分岐デキストラン (デキストランに著量の $\alpha$ -1,2および $\alpha$ -1,3グリコシド結合の分岐構造を有する)、ムタン ( $\alpha$ -1,3グリコシド結合を有する)、ロイテラン ( $\alpha$ -1,4および $\alpha$ -1,6グリコシド結合の複合体) およびアルテルナン ( $\alpha$ -1,6および $\alpha$ -1,3グリコシド結合を交互にもつ) が確認されている<sup>(8-11)</sup>。これらは糖質加水分解酵素データベース (<http://www.cazy.org/>) の糖質加水分解酵素ファミリー70 (GH70) に属するデキストランスクラーゼ (EC 2.4.1.5), ムタンスクラーゼ (EC 2.4.1.5), ロイテランスクラーゼ, アルテルナンスクラーゼ (EC 2.4.1.140),  $\alpha$ -4,6または4,3グルカノトランスフェラーゼ, およびブランチングスクラーゼにて合成される<sup>(12)</sup>。GH70のアミノ酸配列に基づいた系統樹と酵素機能との関係性を解析したところ、これら機能ごとにクラスターが形成される傾向がある (図1)。

GH70酵素の多くはスクロースを基質として $\alpha$ -グリコシド結合を導入するが、グルカノトランスフェラーゼはデンプンを基質とするため、デンプン転換酵素としての利用が報告されている。 $\alpha$ -4,6グルカノトランスフェラーゼはロイテランスクラーゼ (図1, GtfA および GtfO; GenBank Accession No. AAU08015.1 および AAY86923.1) と同様の糖鎖 ( $\alpha$ -1,4および $\alpha$ -1,6グリコシド結合の複合体) を合成するが、基質はスクロースではなくアミロースやマルトオリゴ糖である。*Limosilactobacillus ferment-*

*tum* NCC2970由来の $\alpha$ -4,3グルカノトランスフェラーゼ Lf2970 GtfB (図1, GenBank Accession No. AOR73699.1) においてはアミロースを基質として $\alpha$ -1,3および $\alpha$ -1,4グリコシド結合をもつ新規構造の多糖の合成に成功している<sup>(13, 14)</sup>。

多くのデキストランの分子量は $10^6$ 以上であり、これまでに知られる最も高分子の微生物産生デキストランの一つである *Oenococcus kitaharae* DSM 17330由来の酵素 DSR-OK (図1, GenBank Accession No. WP\_028291708.1) によって合成される多糖は $1 \times 10^9$ と報告されている。DSR-OK 合成多糖は他のデキストランには見られない降伏応力を有し、高い粘度を示すことが示されている<sup>(15)</sup>。

アルテルナンはその凝集性によりナノ粒子を形成するため、高濃度溶液でも沈殿が生じない多糖である。Wangpaiboonら<sup>(16)</sup>は *Leuconostoc citreum* ABK-1由来の酵素 LcALT (図1, GenBank Accession No. AIM52834.1) にて合成したアルテルナンによる約90nmナノ粒子形成を報告するとともに、溶液内濃度の増加に伴いゲル化し溶解度が上昇する特異な物理化学特性を見出している。

デキストランへの著量の分岐構造の付加は、ポリメラーゼ活性が低くブランチング活性の高いブランチングスクラーゼが担っている。主要なブランチングスクラーゼとして BRS-A (GenBank Accession No. CDX66896.1) および BRS-B (GenBank Accession No. CDX65123.1) が知られている<sup>(17, 18)</sup>。それぞれデキストランに $\alpha$ -1,2グリコシド結合および $\alpha$ -1,3グリコシド結合の分岐を付与する酵素であり、付加する分岐構造は異なるがアミノ酸配列の相同性は高い (図1)。 $\alpha$ -1,2グリコシド結合の分岐度は、ブランチングスクラーゼ存在下にてスクロース/デキストラン比を変えることにより13%から40%の範囲で調整できることが報告されており、酵素の最適

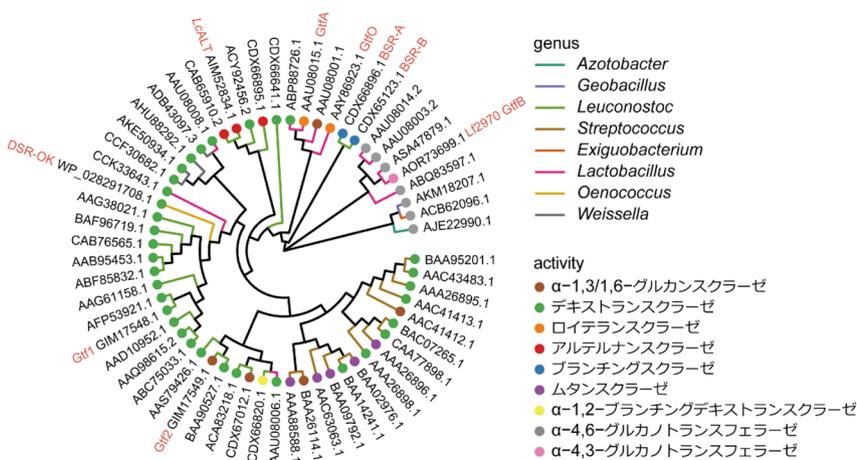


図1 ■ 糖質加水分解酵素ファミリー70酵素のアミノ酸配列から作成した系統樹と、酵素機能の関係

ただし *Lactobacillus* 属は旧分類上の *Lactobacillus* 属で、新分類の *Limosilactobacillus* 属, *Lentilactobacillus* 属, *Latilactobacillus* 属が含まれる。本文中の酵素名を赤字で示した。

な利用によってバラエティに富んだデキストランの創出が可能である<sup>(19)</sup>。

## 2. $\beta$ -フルクタン合成酵素

$\beta$ -フルクタンはイヌリン ( $\beta$ -2,1グリコシド結合) およびレバン ( $\beta$ -2,6グリコシド結合に $\beta$ -2,1グリコシド結合の分岐構造) に分類され、糖質加水分解酵素ファミリー68 (GH68) に属するイヌロスクラーゼ (EC 2.1.4.9) およびレバンスクラーゼ (EC 2.1.4.10) にて合成される。

植物が産生するイヌリンおよびレバンの分子量はいずれも $10^4$ であるが、微生物が産生するイヌリンおよびレバンの分子量は $10^6$ 以上であり、微生物由来のフラクタンはより高分子である<sup>(20, 21)</sup>。レバンは非常に低い固有粘度を有しており<sup>(22)</sup>、Hundchellらは分子量の増加に伴い固有粘度が減少するポリマーであることを報告している<sup>(23)</sup>。

レバンスクラーゼやイヌロスクラーゼにより合成された高分子フルクタンにおいて、*Bacillus velezensis* BM-2由来のレバンを添加したヨーグルトの保水能力や安定性が改善することや植物イヌリンと比べてゲル化能力や保存安定性が向上することなど、顕著な違いが確認されている<sup>(24, 25)</sup>。フルクタン合成酵素の利用例として、ラクトスクロースの産生が挙げられる。ラクトスクロース ( $4^C$ - $\beta$ -D-galactosylsucrose) は基質特異性の幅広い *Arthrobacter* sp. K-1株由来のレバンスクラーゼにて工業的に産生されている。この酵素合成ラクトスクロースについては、寺本らにより腸内カルシウム吸収を促進することが確認され、Kimuraらによって体脂肪の蓄積を阻害することが確認されている<sup>(26-29)</sup>。

## 3. $\beta$ -グルカン合成酵素

微生物が菌体外に分泌する $\beta$ -グルカンに限るとバクテリアセルロース ( $\beta$ -1,4グリコシド結合)、カードラン ( $\beta$ -1,3グリコシド結合) および混合結合型の $\beta$ -グルカン ( $\beta$ -1,4グリコシド結合と $\beta$ -1,3グリコシド結合の混合物) に分類される。 $\beta$ -グルカンの産生には $\beta$ -グルカン合成酵素遺伝子クラスター上にコードされる酵素群が複合的に作用し、それぞれ主鎖構造の形成には糖転移酵素ファミリー2 (GT2) に属する酵素であるバクテリアセルロースシンターゼ (BcsA)、カードランシンターゼ (Crds) およびBgsAにより $\beta$ -グルカンが合成され、その後、分泌に関わる酵素にて菌体外へと分泌される (図2)<sup>(30-33)</sup>。バクテリ

アセルロースはナノファイブリン構造により独特な物理的、機械的特性を有し、高い生体適合性や生分解性から医療分野において応用利用されている<sup>(6, 34)</sup>。また、バクテリアセルロースは様々な修飾を施されることにより、新たな性質が付与される。Dincăらは酸化亜鉛ナノ粒子を蒸着させたバクテリアセルロース膜がグラム陽性およびグラム陰性菌に対する抗菌活性やヒト真皮線維芽細胞に対する生体適合性を有することを報告している<sup>(35)</sup>。

バクテリアセルロースは不純物が含まれておらず、植物セルロースに比べ容易に純粋なセルロースを回収できる。しかし、工業規模での生産には高価であることが課題とされており、安価な条件での生産に向けてバクテリアセルロース産生細菌のスクリーニング、培地条件の最適化、および合成に関わる酵素の過剰発現にて収量を増やす研究が多くなされている<sup>(36, 37)</sup>。

カードランは特異なゲル化特性を有しており、 $80^{\circ}\text{C}$ 以上の加熱後に冷却すると熱不可逆的な高硬化性ゲルとなるが、 $55^{\circ}\text{C}$ の加熱では、熱可逆的な低硬化性のゲルとなることが確認されている<sup>(38)</sup>。

## 菌体外多糖の保健効果とその応用

乳酸菌の産生する菌体外多糖の有するヒトへの保健効果が注目されて久しい。ヒトへの保健効果の誘導には、腸内細菌を介した間接的作用と、腸内細菌を介さない直接的作用とがあり、いずれの作用も菌体外多糖の構造と誘導される機能との相関の解明が、意欲的に進められている。乳酸菌の菌体外多糖および先行して研究されている他の微生物由来の菌体外多糖の保健効果について紹介する。

### 1. 腸内細菌を介した間接的な保健効果

腸内細菌を介した間接的作用には、菌体外多糖が有用な腸内細菌の増殖を促し、有益な代謝産物または活性成分の産生を促すことに起因する。ヒトの消化酵素で分解されない難消化性の菌体外多糖は、いわゆるプレバイオティクス (ヒト消化管で分解されず、腸内の有益な細菌の選択的な栄養源となり、それらの増殖を促進する成分) として腸内細菌による発酵の基質となり、主たる代謝産物として酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸に変換される<sup>(39, 40)</sup>。これら短鎖脂肪酸は、宿主が発現するGタンパク質共役受容体への作用、またはヒスト

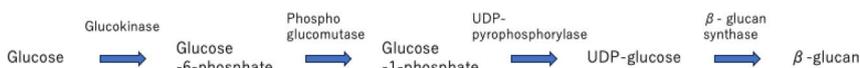


図2 ■  $\beta$ -グルカン合成までの模式図

ンアセチル化亢進などのエピジェネティックな作用を介して、粘膜免疫系の増強、食物アレルギーの抑制、心血管疾患リスクの低減、摂食調節などの脳腸相関を介した代謝改善などの健康の維持・増進に寄与する<sup>(41, 42)</sup>。

腸内細菌を介した保健効果の誘導には、腸内細菌による代謝が必要となるため、機能性の発現には腸内細菌に影響を与えるに足る投与量が必要になる。例えばイヌリンなどのプレバイオティクスの場合、マウス試験では250mg/day投与量で腸内における有益菌増殖効果が認められており<sup>(43)</sup>、ヒトへの用量は4~24g/dayである<sup>(44, 45)</sup>。そのため、プレバイオティクスとしての菌体外多糖の利用は、菌の他の代謝過程と競合する糖スクレオチドを基質として生産されるヘテロ多糖体よりも、糖加水分解酵素による触媒作用を利用して合成されるホモ多糖体またはその合成酵素の利用が、生産量において有利と考えられている。前述の *Arthrobacter* sp. K-1株由来のレバンスクラーズによって工業的に生産されているラクトスクロースは、6g/dayを摂取することでヒト腸内のビフィズス菌を選択的に増やすことが報告されている<sup>(46)</sup>。動物に対し有用機能を発揮するプレバイオティクスとしてデキストランに着眼した研究例も散見される。Sarhiniらは<sup>(47)</sup>、 $\alpha$ -1,2グリコシド結合による分岐がデキストランの総食物繊維量の増加につながり、ヒト糞便培地における消化率を低下させることを示している。さらに、te Poelleらは市販ラット腸アセトン粉末を使用したグルコース生成速度の測定により $\alpha$ -1,3グリコシド結合の増加に伴い消化率が低下することを確認している<sup>(48)</sup>。これらの報告は、分岐構造が付与されることによりデキストランが腸管のグルコシダーゼによる分解に対して耐性を得ることを示している。

*Leuconostoc mesenteroides* NTM048株の産生する菌体外多糖 (LmEPS) は主としてGH70酵素によって合成される4%の $\alpha$ -1,3グリコシド結合を含む $\alpha$ -1,6グルカンを中心成分としている<sup>(49)</sup>。Miyamoto<sup>(50)</sup>らによってこのLmEPSは腸内細菌 *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Muribaculum intestinale*, *Paramuribaculum intestinale*, *Duncaniella muris* の増殖を促し、腸内の短鎖脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸) を増加させて、肥満抑制に寄与することを明らかにされた。

我々の研究室では、 $\alpha$ -1,6グルカンの分子サイズが機能性を与える影響を調べている (図3)。LmEPSまたはこのLmEPSを合成するGH70酵素のひとつであるGtf1 (図1 GenBank Accession No. GIM17548.1) から合成した長鎖の $\alpha$ -1,6グルカン (それぞれ $1.0 \times 10^7$ または $3.1 \times$

$10^6$ ) においては、Miyamotoら<sup>(50)</sup>の結果と同様、腸内細菌 *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron* が生育し腸内の代謝改善に寄与する効果が期待される結果が得られた。興味深いことに、 $2.0 \times 10^5$ 以下の分子サイズでは、上記細菌に加えて心血管疾患予防効果などが報告されている *Parabacteroides* 属<sup>(61)</sup>の増殖にも寄与していた。菌体外多糖の分子サイズが腸内細菌の選択的増殖に直接影響することが示唆される。一方、LmEPSを合成する他のGH70酵素Gtf2 (図1 GenBank Accession No. GIM17549.1) から合成した $\alpha$ -1,3/1,6グルカンは腸内細菌によって資化されず (図3)、腸内細菌を介した間接的な保健効果は期待できない一方、直接的な保健効果が認められた (次節参照)。

近年、糖スクレオチドを基質とする糖転移酵素を利用したヒトミルクオリゴ糖の生産が遺伝子組換え大腸菌や酵母を用いてg/L単位で可能となっており<sup>(62)</sup>、今後、ホモ多糖体の利用だけではなく安価なヘテロ多糖体生産系の構築も可能となることが予想される。

## 2. 直接的な保健効果

免疫刺激物質 (アジュバント) とは免疫細胞表面に発現しているパターン認識受容体によって認識されて免疫細胞を活性化する成分であり、自然免疫を誘導して宿主の免疫力を増強する効果のみならず、ワクチンによる免疫応答を高めて抗体産生を効果的に誘導する成分としての利用が注目されている。これまでの菌体外多糖の免疫細胞への刺激の効果を評価した報告から (表1)、菌体外多糖もパターン認識受容体によって認識され、直接的に免疫細胞を刺激する効果が報告されている。しかしながら菌体外多糖を認識するパターン認識受容体の種類およびその後の機能性誘導経路は様々ではない。

*Saccharomyces cerevisiae* 由来の微粒子状の $\beta$ -グルカン ( $\beta$ -1,3/1,6グリコシド結合) は、マウス皮内投与試験において牛血清由来のアルブミン特異的IgG抗体を誘導する効果が<sup>(63)</sup>、マウス皮下投与試験においてオポアルブミン特異的IgGを誘導する効果が報告されており<sup>(64)</sup>、獲得免疫系を誘導してワクチンによる抗体産生を高めるアジュバントとして期待される。 $\beta$ -グルカンはDectin-1 (dendritic cell-associated C-type lectin-1), CR3 (complement receptor 3), TLR (Toll like receptor) 2, 4, 5などのパターン認識受容体によって認識される<sup>(65, 66)</sup>。Dectin-1においては、受容体の細胞外ドメインであるC-typeレクチンドメインにて認識されると考えられているが詳細な結合機序は未だ明らかではない。 $\beta$ -グルカンの結合によりDectin-1の細胞内ドメインであるITAM

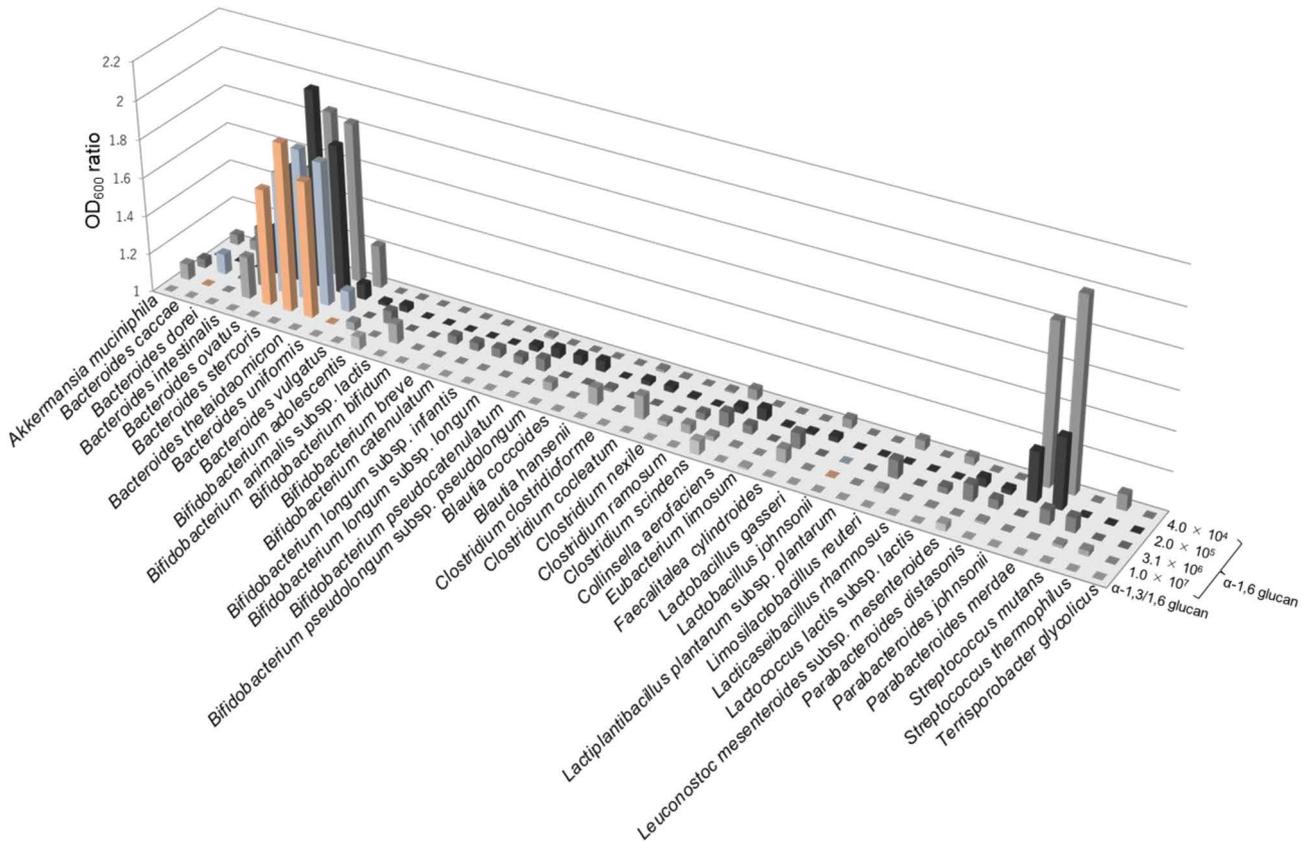


図3 ■  $\alpha$ -グルカンの腸内細菌による資化性の比較

各 $\alpha$ -グルカンに対する菌の生育を、糖源未含有培地との濁度 ( $OD_{600}$ ) の比で測定.  $4.0 \times 10^4$   $\alpha$ -1,6グルカン: Sigma D1662,  $2.0 \times 10^5$   $\alpha$ -1,6グルカン: Sigma 31398,  $3.1 \times 10^6$   $\alpha$ -1,6グルカン: 酵素Gtf1より合成,  $1.0 \times 10^7$   $\alpha$ -1,6グルカン: LmEPS,  $\alpha$ -1,3/1,6グルカン: 酵素Gtf2より合成.

(immunoreceptor tyrosine-based-activation motif) の2量体構造が安定化して、下流のSyk (spleen tyrosine kinase) 依存経路またはSky非依存経路のシグナルが活性化し、いずれの経路でもNF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) による転写を誘導するが、この場合、食生活性と細胞障害活性が向上する<sup>(57)</sup>. アジュバント効果に重要な獲得免疫を誘導するためには、Dectin-1による刺激とともにTLRとそのアダプター分子MyD88 (myeloid differentiation factor 88) を介したシグナルが必要となる<sup>(58)</sup>. さらに $\beta$ -グルカンは補体受容体CR3 (補体分子iC3bのレセプター) へも結合し、CR3によるシグナルを増強することが知られている. マクロファージによって貪食された粒子状の $\beta$ -グルカンは、未だ解明されていない経路によって小分子の可溶性 $\beta$ -グルカン (約25 kDa) に分解された後、このマクロファージから放出される. 続いてその小分子 $\beta$ -グルカンは好中球の発現するCR3のレクチンドメインに結合し、CR3の異なるドメイン (I-ドメイン) に結合する補体分子iC3bと協調してSyk-PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 経路を刺激し好中球の細胞障害性を増強する<sup>(59)</sup>. このようにマクロファージ

によって部分分解された高分子菌体外多糖の分解産物が、パターン認識受容体のリガンドとなるような免疫刺激経路が他にもあると考えられ、他の菌体外多糖への研究の展開が求められる.

*L. mesenteroides* NTM048の産生する菌体外多糖LmEPS成分のうち、前述したGtf2 (図1 GenBank Accession No. GIM17549.1) から合成した $\alpha$ -1,3/1,6グルカンは腸内細菌によって資化されない多糖である. マウスへの経鼻感作試験によってオボアルブミン特異的抗体を気道粘膜に誘導できることから<sup>(60)</sup>, やはり粘膜ワクチンによる抗体産生効果を高めるアジュバントとして期待されている. LmEPSの刺激を受けた樹状細胞において、IL-6, IL-10, IL-12およびレチナール脱水素酵素遺伝子の発現が上昇し、T細胞を介した抗体産生誘導経路によって抗原特異的抗体の産生が上昇する<sup>(49, 61)</sup>. HEK-298細胞を用いたレポーターアッセイによる検討からこの多糖はTLR2, 4, 5などのパターン認識受容体によって認識される成分であることが明らかになっており (未発表データ),  $\beta$ -グルカンは異なる経路によって抗原特異的抗体が誘導されていると考えられる.

表1 ■ 菌体外多糖の構造と認識するパターン認識受容体

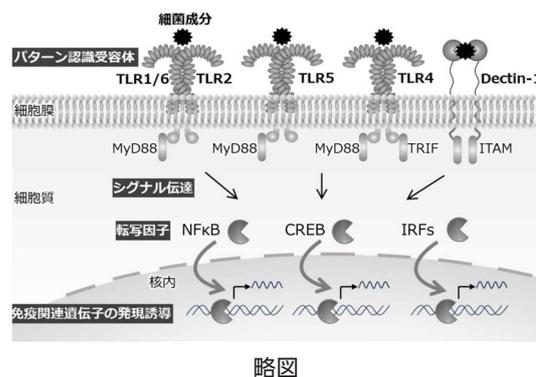
構造	菌株	パターン認識受容体 (PRR)	PRR 発現細胞	免疫誘導活性	参考文献
Zymosan Depleted, particulate $\beta$ -1,3/1,6-glucan, particle size 3 $\mu$ m, 240kDa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR2, 4 and 5 when co-bound together to Dectin-1	HEK, THP-1 macrophage cell	stimulation of Dectin-1 signal via TLR4 inhibition of Dectin-1 signal via TLR2 and 5	56
$\alpha$ -1,6 glucan containing 4% of $\alpha$ -1,3 linked glucose and 6% of $\beta$ -fructan	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NTM048	TLR2, TLR4, TLR5		Induction of antigen-specific IgA	50, 62
mannose (88%) and glucose (11.9%)	<i>Bacillus subtilis</i>	TLR4	bone marrow-derived dendritic cells	induction of anti-inflammatory M2 macrophage, suppression of T-cell activation by induction of inhibitory dendritic cells	63, 64
galactofuranose, galactopyranose, and <i>N</i> -acetylgalactosamine (1:1:2), 500kDa	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	TLR2	RAW264.7 macrophages	induction of nitric oxide, TNF- $\alpha$ , and IL-6	66
branched hexasaccharide repeating unit containing two galactose and two glucose moieties, galacturonic acid, and the 6-deoxy- <i>D</i> -talose	<i>Bifidobacterium longum</i> 35624	TLR2	dendritic cells, inflammatory preclinical model	suppression of pro-inflammatory responses by increasing regulatory T-cells and IL-10 production	67, 68
zwitterionic polysaccharides possessing free amino, <i>N</i> -acetyl, and carboxyl groups (polysaccharide A)	<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC9343	TLR2	murine bone marrow derived osteoclast precursors	inhibitory effect on bone-resorbing osteoclast formation by stimulation of TLR2/MyD88 signaling	69, 70
galactosamine, glucosamine, glucose, mannose, and glucuronic acid with a molar ratio of 1:1.4:4:96:2, $3.84 \times 10^5$ Da	<i>Lactobacillus plantarum</i> NCU116	TLR2	BALB/c mice	Treg induction and IL-10 expression through TLR2 signaling	71, 72
Acidic extracellular polysaccharide	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> TU-A4408L	TLR4	mouse epithelial colorectal carcinoma cell line CT26	the activation of TLR2 and JNK/c-Jun dependent Fas/FasL-mediated apoptotic pathway	73
Neutral extracellular polysaccharide	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> TU-A4408L	TLR2, TLR4	porcin intestinal epithelial cells	down-regulation of expression of IL-8, IL-6, and MCP-1	74
Neutral extracellular polysaccharide	<i>Lactobacillus plantarum</i> N14	TLR2	porcin intestinal epithelial cells	down-regulation of expression of MCP-1	75
Acidic extracellular polysaccharide	<i>Lactobacillus plantarum</i> N14	RP105, TLR4	porcin intestinal epithelial cells	down-regulation of expression of IL-8, IL-6, and MCP-1	75

## ◇◇◇ コラム ◇◇◇

高校の授業では、様々な知識が断片的に蓄積されるが、大学の研究ではその知識が融合されていくところが面白い。高校生物の『免疫』の項にて、樹状細胞やマクロファージは、細菌の成分を「認識」して「自然免疫系を活性化」する役割を担う白血球として登場する。この「認識」とは、免疫細胞の発現するパターン認識受容体 (PRR) に細菌成分が認識されることである。本文の表1で解説しているように、菌体外多糖も PRR によって「認識」されて細胞内にシグナルが伝達される。その概要をコラム中の略図にて示している。

細胞内シグナル伝達によって活性化した転写因子が核内へ移行して、「自然免疫系の活性化」に関与する遺伝子の発現誘導がおこなわれる。ここで重要な役割を果たす遺伝子発現は高校生物では『遺伝』の項にて登場する。またシグナル伝達に重要な役割を果たしているのは細胞質中に存在している酵素であるが、こちらは高校化学の『酵素』の項にて学ぶ分野である。関与する様々な分子の機能を知るためには分

子構造を解明する必要があるが、構造情報は高校物理で学ぶ『波形』データとして得られ、波形データの解析には高校数学の『微分・積分』の知識が必要となる。突き詰めていくと最終的に高校では学ばない『哲学』の領域に行き着くと言われているが、残念ながら私は到達できそうにない。若い皆様が『哲学』の領域まで到達し、未知の世界を見てくれることを祈念している。



腸内の病原体に起因するアレルギー症状や大腸炎を抑制する効果を有する *Bacillus subtilis* 由来の菌体外多糖 (構成糖: マンノース, グルコース) はパターン認識受容体の一つ TLR4 のリガンドである。この多糖は樹状細胞の発現する TLR4 を介して L-トリプトファンからのキヌレニン生合成を促進するIDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) を誘導し、キヌレニンは転写因子 AhR (aryl hydrocarbon receptor) との複合体形成を介して免疫抑制性樹状細胞 (tolerogenic DC) の誘導とそれに伴う T 細胞の増殖抑制に寄与する<sup>(62, 63)</sup>。それに対し同じ TLR4 のリガンドであるグラム陰性菌由来のリポ多糖 (LPS) による刺激では、TLR4 と炎症反応を促進する補助レセプター CD14 との会合により、炎症性サイトカインが誘導される<sup>(63, 64)</sup>。

Toll-like receptor (TLR) 2 も菌体外多糖を認識する受容体である。 *Thermus aquaticus* 由来のヘテロ多糖体 (構成糖: ガラクトフラノース, ガラクトピラノース, N-アセチルガラクトサミン) は TLR2 のリガンドであり、アダプター分子 MyD88/TIRAP (Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein) を介して転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化し、マクロファージによる炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- $\alpha$ ) や一酸化窒素の産生を誘導する<sup>(65)</sup>。一方 *Bifidobacterium longum* 35624 株由来のヘテロ多糖体 (構成糖: ガラクトース, グルコース, ガラクトツロン酸, 6-デオキシ-L-タロース) も TLR2

のリガンドであるが、IL-6 とともに抑制性のサイトカイン IL-10 も誘導し、炎症抑制に寄与する。また本多糖体による TLR2 の刺激は MyD88 を介して破骨細胞分化を抑制して骨粗鬆症リスクを軽減することも報告されている<sup>(66~69)</sup>。 *Bacteroides fragilis* の産生する両性イオン多糖ポリサッカライド A は TLR2 のシグナルを介して制御性 T 細胞のマスター転写因子 Foxp3 (Forkhead Box transcription factor protein) を誘導する。制御性 T 細胞は IL-10 を産生して Th17 細胞を抑制、大腸炎抑制に寄与する<sup>(70, 71)</sup>。 *Lactiplantibacillus plantarum* NCU116 株由来のヘテロ多糖体 (構成糖: ガラクトサミン, グルコサミン, グルコース, マンノース, グルクロン酸) も、マウス大腸がん細胞株に発現する TLR2 を介して JNK (c-Jun N-terminal kinase)/ c-Jun 経路を刺激し、転写制御因子 c-Jun はデス因子 Fas リガンドの発現を誘導してがん細胞のアポトーシスを誘導する<sup>(72)</sup>。

同じ菌株が産生した菌体外多糖でも酸性多糖と中性多糖では関与するパターン認識受容体が異なることが、ブタ腸管上皮細胞株を用いた研究で解析されている。 *Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L 由来の酸性多糖は TLR4 に、中性多糖は TLR2 と TLR4 の双方に作用することにより、TLR4/MD4 複合体による炎症性シグナルを負に制御して、IL-8, IL-6, MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1) を低下させる<sup>(73)</sup>。 *Lactobacillus plantarum* N14 由来の酸性多糖は TLR4 とともに TLR ファ

ミリーに属するRP105 (radioprotective 105) にも作用して, IL-8, IL-6, MCP-1を抑制するが, 中性多糖はTLR2に作用してMCP-1を抑制する<sup>(74)</sup>.

経口で摂取した場合, これらパターン認識受容体によって認識される菌体外多糖類は免疫細胞を直接刺激できるため, 間接的に機能性を誘導する菌体外多糖類と比較して少量の摂取量で効果を誘導することができる. 酵母 *S. cerevisiae* 由来の $\beta$ -グルカンにおいて, マウスへの投与量25mg/dayで腸管上皮細胞間リンパ球が増加し腸管免疫系を増強する効果が<sup>(75)</sup>, ヒトへの投与量250~900mg/dayで上気道感染症を予防する効果が認められている<sup>(58)</sup>.

### 終わりに

乳酸菌の機能性が菌株レベルで異なるように, 菌体外多糖の機能性も菌株レベルで異なっておりそのことが産業利用の妨げとなっていた. しかしながら近年の構造と機能性解析の発展により, 適切な生産系の構築やターゲットを絞った機能の利用が可能となる知見が深化している. これら研究基盤を活用することが産業レベルの応用への近道となると考えている.

### 文献

- 1) D. Abarquero, E. Renes, J. M. Fresno & M. E. Tornadijo: *Int. J. Food Sci. Technol.*, **57**, 16 (2022).
- 2) W. Tang, M. Dong, W. Wang, S. Han, X. Rui, X. Chen, M. Jiang, Q. Zhang, J. Wu & W. Li: *Carbohydr. Polym.*, **173**, 654 (2017).
- 3) G. Ye, G. Li, C. Wang, B. Ling, R. Yang & S. Huang: *Carbohydr. Polym.*, **207**, 218 (2019).
- 4) L. Gan, G. Jiang, X. Li, S. Zhang, Y. Tian & B. Peng: *Food Chem.*, **365**, 130496 (2021).
- 5) J. Gangoiti, X. Meng, A. Lammerts van Bueren & L. Dijkhuizen: *Genome Announc.*, **5**, e01691 (2017).
- 6) N. H. Avcioglu: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 86 (2022).
- 7) M. Yuan, G. Fu, Y. Sun & D. Zhang: *Carbohydr. Polym.*, **273**, 118597 (2021).
- 8) H. Leemhuis, T. Pijning, J. M. Dobruchowska, S. S. van Leeuwen, S. Kralj, B. W. Dijkstra & L. Dijkhuizen: *J. Biotechnol.*, **163**, 250 (2013).
- 9) M. S. Bounaix, V. Gabriel, S. Morel, H. Robert, P. Rabier, M. Remaud-Siméon, B. Gabriel & C. Fontagné-Faucher: *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 10889 (2009).
- 10) H. M. Davis, H. B. Hines & J. R. Edwards: *Carbohydr. Res.*, **156**, 69 (1986).
- 11) S. Kralj, G. H. van Geel-Schutten, M. J. E. C. van der Maarel & L. Dijkhuizen: *Microbiology (Reading)*, **150**, 2099 (2004).
- 12) X. Li, X. Wang, X. Meng, L. Dijkhuizen & W. Liu: *Carbohydr. Polym.*, **249**, 116818 (2020).
- 13) M. Miao, B. Jiang, Z. Jin & J. N. BeMiller: *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **17**, 1238 (2018).
- 14) J. Gangoiti, S. S. van Leeuwen, G. J. Gerwig, S. Duboux, C. Vafiadi, T. Pijning & L. Dijkhuizen: *Sci. Rep.*, **7**, 39761 (2017).
- 15) M. Vuillemin, F. Grimaud, M. Claverie, A. Rolland-Sabaté, C. Garnier, P. Lucas, P. Monsan, M. Dols-Lafargue, M. Remaud-Siméon & C. Moulis: *Carbohydr. Polym.*, **179**, 10 (2018).
- 16) K. Wangpaiboon, P. Padungros, S. Nakapong, T. Charoenwongpaiboon, M. Rejzek, R. A. Field & R. Pichyangkura: *Sci. Rep.*, **8**, 8340 (2018).
- 17) D. Passerini, M. Vuillemin, L. Ufarté, S. Morel, V. Loux, C. Fontagné-Faucher, P. Monsan, M. Remaud-Siméon & C. Moulis: *FEBS J.*, **282**, 2115 (2015).
- 18) M. Vuillemin, M. Claverie, Y. Brison, E. Séverac, P. Bondy, S. Morel, P. Monsan, C. Moulis & M. Remaud-Siméon: *J. Biol. Chem.*, **291**, 7687 (2016).
- 19) Y. Brison, E. Fabre, C. Moulis, J. C. Portais, P. Monsan & M. Remaud-Siméon: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 545 (2010).
- 20) R. Srikanth, C. H. Reddy, G. Siddartha, M. J. Ramaiah & K. B. Uppuluri: *Carbohydr. Polym.*, **120**, 102 (2015).
- 21) D. Ni, W. Xu, Y. Zhu, W. Zhang, T. Zhang, C. Guang & W. Mu: *Biotechnol. Adv.*, **37**, 306 (2019).
- 22) J. Ehrlich, S. S. Stivala, W. S. Bahary, S. K. Garg, L. W. Long & E. Newbrun: *J. Dent. Res.*, **54**, 290 (1975).
- 23) C. S. Hundscheil, F. Jakob & A. M. Wagemans: *Int. J. Biol. Macromol.*, **161**, 398 (2020).
- 24) D. Ni, Y. Zhu, W. Xu, X. Pang, J. Lv & W. Mu: *J. Agric. Food Chem.*, **68**, 5854 (2020).
- 25) M. Xu, L. Pan, Z. Zhou & Y. Han: *Carbohydr. Polym.*, **291**, 119519 (2022).
- 26) 荒川勝隆, 青山葉子, 池田 宏, 三國克彦, 藤田孝輝, 原 耕三: *J. of Appl. Glycosci.*, **49**, 63 (2002).
- 27) Y. Kimura, Y. Nagata, C. W. Bryant & R. K. Buddington: *J. Nutr.*, **132**, 80 (2002).
- 28) F. Teramoto, K. Rokutan, Y. Sugano, K. Oku, E. Kishino, K. Fujita, K. Hara, K. Kishi, M. Fukunaga & T. Morita: *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **52**, 337 (2006).
- 29) K. Fujita, T. Ito & E. Kishino: *Seito Gijutsu Kenkyukai-shi*, **57**, 13 (2009).
- 30) U. Römling & M. Y. Galperin: *Trends Microbiol.*, **23**, 545 (2015).
- 31) S. J. Stasinopoulos, P. R. Fisher, B. A. Stone & V. A. Stanisich: *Glycobiology*, **9**, 31 (1999).
- 32) D. Pérez-Mendoza, M. Á. Rodríguez-Carvajal, L. Romero-Jiménez, G. A. Farias, J. Llore, M. T. Gallegos & J. Sanjuán: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E757 (2015).
- 33) P. Jacek, F. Dourado, M. Gama & S. Bielecki: *Microb. Biotechnol.*, **12**, 633 (2019).
- 34) P. V. Navya, V. Gayathri, D. Samanta & S. Sampath: *Int. J. Biol. Macromol.*, **220**, 435 (2022).
- 35) V. Dincă, A. Mocanu, G. Isopenicu, C. Busuioc, S. Brajnicov, A. Vlad, M. Icriverzi, A. Roseanu, M. Dinescu, M. Stroescu *et al.*: *Arab. J. Chem.*, **13**, 3521 (2020).
- 36) L. Yang, X. Zhu, Y. Chen & J. Wang: *Int. J. Biol. Macromol.*, **260**, 129552 (2024).
- 37) M. U. Rani, N. K. Rastogi & K. A. Anu Appaiah: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 739 (2011).
- 38) C. Laroche & P. Michaud: *Recent Pat. Biotechnol.*, **1**, 59 (2007).

- 39) A. Koh, F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary & F. Bäckhed: *Cell*, **165**, 1332 (2016).
- 40) J. Miyamoto, H. Shimizu, K. Hisa, C. Matsuzaki, S. Inuki, Y. Ando, A. Nishida, A. Izumi, M. Yamano, C. Ushiroda *et al.*: *Gut Microbes*, **15**, 2161271 (2023).
- 41) A. Nogal, A. M. Valdes & C. Menni: *Gut Microbes*, **13**, 1897212 (2021).
- 42) B. Dalile, L. Van Oudenhove, B. Vervliet & K. Verbeke: *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**, 461 (2019).
- 43) N. Takemura, K. Ozawa, N. Kimura, J. Watanabe & K. Sonoyama: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 375 (2010).
- 44) M. Roberfroid: *J. Nutr.*, **137(Suppl 2)**, 830S (2007).
- 45) J. Tarini & T. M. Wolever: *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, **35**, 9 (2010).
- 46) T. Ohkusa, Y. Ozaki, C. Sato, K. Mikuni & H. Ikeda: *Digestion*, **56**, 415 (1995).
- 47) S. R. Sarbini, S. Kolida, T. Naeye, A. Einerhand, Y. Brison, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, G. R. Gibson & R. A. Rastall: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 5307 (2011).
- 48) E. M. te Poele, S. G. Corwin, B. R. Hamaker, L. M. Lamothe, C. Vafiadi & L. Dijkhuizen: *J. Agric. Food Chem.*, **68**, 6664 (2020).
- 49) C. Matsuzaki, C. Takagaki, Y. Tomabechi, L. S. Forsberg, C. Heiss, P. Azadi, K. Matsumoto, T. Katoh, K. Hosomi, J. Kunisawa *et al.*: *Carbohydr. Res.*, **448**, 95 (2017).
- 50) J. Miyamoto, H. Shimizu, K. Hisa, C. Matsuzaki, S. Inuki, Y. Ando, A. Nishida, A. Izumi, M. Yamano, C. Ushiroda *et al.*: *Gut Microbes*, **15**, 2161271 (2023).
- 51) S. Qiao, C. Liu, L. Sun, T. Wang, H. Dai, K. Wang, L. Bao, H. Li, W. Wang, S. J. Liu *et al.*: *Nat. Metab.*, **4**, 1271 (2022).
- 52) D. S. K. Palur, S. R. Pressley & S. Atsumi: *Molecules*, **28**, 1491 (2023).
- 53) V. K. Berner, M. E. Sura & K. W. Hunter Jr.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 1053 (2008).
- 54) H. Huang, G. R. Ostroff, C. K. Lee, C. A. Specht & S. M. Levitz: *MBio*, **1**, e00164 (2010).
- 55) P. Kanjan, N. M. Sahasrabudhe, B. J. de Haan & P. de Vos: *J. Funct. Foods*, **37**, 433 (2017).
- 56) A. B. C. Samuelsen, J. Schrezenmeir & S. H. Knutsen: *Mol. Nutr. Food Res.*, **58**, 183 (2014).
- 57) T. Haas, S. Heidegger, A. Wintges, M. Bscheider, S. Bek, J. C. Fischer, G. Eisenkolb, M. Schmickl, S. Spoerl, C. Peschel *et al.*: *Eur. J. Immunol.*, **47**, 872 (2017).
- 58) N. M. Sahasrabudhe, J. Dokter-Fokkens & P. de Vos: *Mol. Nutr. Food Res.*, **60**, 2514 (2016).
- 59) X. M. O' Brien, K. E. Heflin, L. M. Lavigne, K. Yu, M. Kim, A. R. Salomon & J. S. Reichner: *J. Biol. Chem.*, **287**, 3337 (2012).
- 60) C. Matsuzaki, Y. Nakashima, I. Endo, Y. Tomabechi, Y. Higashimura, S. Itonori, K. Hosomi, J. Kunisawa, K. Yamamoto & K. Hisa: *Gut Microbes*, **13**, 1949097 (2021).
- 61) C. Matsuzaki, C. Takagaki, Y. Higashimura, Y. Nakashima, K. Hosomi, J. Kunisawa, K. Yamamoto & K. Hisa: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **82**, 1647 (2018).
- 62) S. E. Jones, M. L. Paynich, D. B. Kearns & K. L. Knight: *J. Immunol.*, **192**, 4813 (2014).
- 63) J. Zamora-Pineda, O. Kalinina, A. I. Sperling & K. L. Knight: *J. Immunol.*, **211**, 1232 (2023).
- 64) K. L. Chan, K. F. Wong & J. M. Luk: *World J. Gastroenterol.*, **15**, 4745 (2009).
- 65) M. H. Lin, Y. L. Yang, Y. P. Chen, K. F. Hua, C. P. Lu, F. Sheu, G. Lin, S. S. Tsay, S. M. Liang & S. H. Wu: *J. Biol. Chem.*, **286**, 17736 (2011).
- 66) E. Schiavi, M. Gleinser, E. Molloy, D. Groeger, R. Frei, R. Ferstl, N. Rodriguez-Perez, M. Ziegler, R. Grant, T. F. Moriarty *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 7185 (2016).
- 67) E. Schiavi, S. Plattner, N. Rodriguez-Perez, W. Barcik, R. Frei, R. Ferstl, M. Kurnik-Lucka, D. Groeger, R. Grant, J. Roper *et al.*: *Benef. Microbes*, **9**, 761 (2018).
- 68) A. Wallimann, M. Hildebrand, D. Groeger, B. Stanic, C. A. Akdis, S. Zeiter, R. Geoff Richards, T. Fintan Moriarty, L. O' Mahony & K. Thompson: *Calcif. Tissue Int.*, **108**, 654 (2021).
- 69) F. Altmann, P. Kosma, A. O' Callaghan, S. Leahy, F. Bottacini, E. Molloy, S. Plattner, E. Schiavi, M. Gleinser, D. Groeger *et al.*: *PLoS One*, **11**, e0162983 (2016).
- 70) J. L. Round & S. K. Mazmanian: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12204 (2010).
- 71) A. O. Tzianabos, R. W. Finberg, Y. Wang, M. Chan, A. B. Onderdonk, H. J. Jennings & D. L. Kasper: *J. Biol. Chem.*, **275**, 6733 (2000).
- 72) X. Zhou, T. Hong, Q. Yu, S. Nie, D. Gong, T. Xiong & M. Xie: *Sci. Rep.*, **7**, 14247 (2017).
- 73) S. Wachi, P. Kanmani, Y. Tomosada, H. Kobayashi, T. Yuri, S. Egusa, T. Shimazu, Y. Suda, H. Aso, M. Sugawara *et al.*: *Mol. Nutr. Food Res.*, **58**, 2080 (2014).
- 74) Y. Murofushi, J. Villena, K. Morie, P. Kanmani, M. Tohno, T. Shimazu, H. Aso, Y. Suda, K. Hashiguchi, T. Saito *et al.*: *Mol. Immunol.*, **64**, 63 (2015).
- 75) C. Tsukada, H. Yokoyama, C. Miyaji, Y. Ishimoto, H. Kawamura & T. Abo: *Cell. Immunol.*, **221**, 1 (2003).

## プロフィール



吉田 健太郎 (Kentaro YOSHIDA)

<略歴>2021年石川県立大学生物資源環境学部食品科学科卒/2023年同大学大学院生物資源環境学研究科博士前期課程修了/2024年同大学大学院生物資源環境学研究科博士後期課程, 現在に至る<研究テーマと抱負>乳酸菌が産生するEPSの酵素に関する研究<趣味>料理



小柳 喬 (Takashi KOYANAGI)

<略歴>2000年京都大学農学部生物機能科学科卒業/同年同大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻修士課程修了/2006年同大学大学院博士課程認定退学/2007年京都大学博士(生命科学)/2006年石川県立大学生物資源工学研究所研究員/2009年同大学食品科学科助教/2013年同大学准教授, 現在に至る<研究テーマと抱負>伝統発酵食品と乳酸菌のかかわりや微生物挙動の解明. 発酵食品由来乳酸菌の有用成分産生能の解明. 伝統発酵食品の微生物学的全貌を詳細に把握したい<趣味>バイオリン



松崎 千秋 (Chiaki MATSUZAKI)

＜略歴＞1995年神戸大学農学部園芸農学科卒業／1997年同大学大学院自然科学研究科博士前期課程修了／2012年石川県立大学大学院生物資源環境学研究科博士後期課程修了／同年同大学生物資源工学研究所研究員／2016年同大学生物資源工学研究所助教／2020年同大学生物資源工学研究所講師，現在に至る＜研究テーマと抱負＞乳酸菌の有用な機能性を発揮している原因因子を解明して，応用につなげていきたい  
＜趣味＞ジョギング，娘との文通

Copyright © 2024 公益社団法人日本農芸化学会  
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.62.273