

「杉山産業化学研究所 研究助成」

研究成果報告書

石川県立大学 生物資源工学研究所

松崎千秋

平成 30 年度 研究課題

「粘膜免疫を賦活する乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* 由来菌体外多糖の酵素合成のための基盤研究」

目的

乳酸菌の産生する菌体外多糖（EPS）には、免疫賦活効果、抗アレルギー作用、プレバイオティクス効果など、様々な機能が報告されている。しかしながら乳酸菌を用いた EPS 生産系においては、培地や培養条件の微細な違いにより、生産される EPS の量や機能が大きく変化するため、安定した EPS 生産が困難である。これら乳酸菌由来の EPS を機能性食品として広く利用するには、品質の安定した EPS 生産系の構築が求められている。本研究室ではこれまでに、エンドウマメより単離した *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株が産生する EPS に高い粘膜免疫賦活活性を見出しており、ドラフトゲノム解析の結果、その EPS を合成する 3 つの EPS 合成酵素遺伝子を明らかにしている。そこで本研究ではこれら EPS 合成酵素を利用して安定した品質の EPS の生産を試みた。EPS 合成酵素の大腸菌発現系を構築し、組み換え酵素を用いて機能性の高い EPS を酵素合成する方法を構築した。酵素合成することにより、安定した機能性を有する EPS を、菌体成分のコンタミネーションリスクなく、大量生産することが可能となる。

研究成果

3 種類の EPS 合成酵素の大腸菌発現系を構築し、活性のある組み換え酵素を取得した。それら酵素の至適 pH、至適温度、速度論的パラメーターの解析を行い、EPS 合成反応条件の最適化を試みた。また、それぞれの酵素または反応条件によって合成される EPS の糖鎖構造の違いを解析し、機能性を評価した。

1 種類の EPS 合成酵素を用いて酵素反応条件を最適化した結果、粘膜より侵入するウイルスなどの病原体に対する防御効果の高い、抗原特異的イムノグロブリン A (IgA) を誘導する EPS を合成することに成功した。得られた合成 EPS は、BALB/cA マウスを用いた経鼻感作モデルにおいて、抗原特異的 IgA を肺や気道の粘膜上に誘導できることを確認した。

他の EPS 合成酵素を用いて酵素反応条件を最適化した結果、ヒトの腸内細菌による有益な代謝産物である短鎖脂肪酸を増強するようなプレバイオティクス効果の高い EPS を合成することに成功した。得られた合成 EPS を用いてヒト腸内細菌 43 種に対する資化性を確認

したところ、6種の菌において資化され、短鎖脂肪酸のうち酢酸とプロピオン酸を生産するプレバイオティクス効果を確認した。

今まで機能と構造の関連性が不明瞭であったEPSの分野において、酵素合成した均質なEPSを用いて比較することにより、粘膜免疫誘導に重要となる多糖構造と、プレバイオティクス効果に重要となる多糖構造が異なることを明らかにすることができた。これらの研究結果は、EPSを食品産業・健康産業などへと利用展開するうえで重要な知見となると考えられる。

参考文献

上記の成果は、下記論文・学会・シンポジウムで発表を行った。

Matsuzaki, C. (corresponding author), Takagaki, C., Higashimura, Y., Nakashima, Y.,

Hosomi, K., Kunisawa, J., Yamamoto, K., and Hisa, K. (2018) Immunostimulatory effect on dendritic cells of the adjuvant-active exopolysaccharide from *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1647-1651.

松崎千秋、高柿力丈、東村泰希、中島由香里、細見晃司、國澤純、山本憲二、久景子 「アジュバント活性を有する *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株由来菌体外多糖による樹状細胞への免疫誘導効果」(2018年7月)日本乳酸菌学会2018年度大会(東京)

松崎千秋、高柿力丈、東村泰希、中島由香里、細見晃司、國澤純、山本憲二、久景子 「乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株由来菌体外多糖による粘膜免疫誘導効果」(2018年11月)日本食品免疫学会2018年度大会(東京)

Matsuzaki, C., Takagaki, C., Higashimura, Y., Nakashima, Y., Hosomi, K., Kunisawa, J.,

Yamamoto, K., Hisa K. (2018) Exopolysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 enhances antigen-specific IgA secretion. 7th Beneficial Microbe Conference (Netherlands)

松崎千秋 (招待講演) 「乳酸菌と人との関わり～菌体外高分子多糖を介して～」令和元年度エクセレントコア「天然マテリアル」研究拠点シンポジウム(2019年10月)(北陸先端科学技術大学院大学)

謝辞

本研究を遂行するにあたりご支援いただきました一般財団法人杉山産業化学研究所ならびに関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。