

## 乳酸菌の産生する機能性菌体外多糖の医薬・食品産業への応用に向けた基盤構築



石川県立大学生物資源工学研究所 松崎千秋

## はじめに

プロバイオティクスとは、ヒトが摂取した際に身体に有益な影響を与えてくれる生きた微生物であり、これまでにアレルギー抑制効果、血中コレステロール低減作用、病原体からの感染防御効果、抗腫瘍効果など、様々な機能性を有する乳酸菌がプロバイオティクスとして報告されている。高齢者人口の増加に伴い、高齢で低下する免疫力を増強するプロバイオティクスの利用は、医薬・食品産業から高い注目を集めている。

しかしこのような社会的ニーズの高まりにも関わらず、これらプロバイオティクス乳酸菌の免疫誘導成分の分子レベルでの知見はほとんど得られていないのが現状である。そこで我々の研究グループは、プロバイオティクス乳酸菌の免疫増強活性に着目し、その機能性に関する科学的根拠の確立は、今後の医薬・食品産業への積極的利用のために不可避の基盤研究と位置づけて、研究を進めた。

## 1. 粘膜免疫を増強するプロバイオティクス乳酸菌の発見

多くの人々を死にいたらしめる病原体のほとんどは粘膜を介して生体内に侵入する。そのため粘膜免疫系の強化が、最も効果的な感染防御対策に挙げられる。我々は、粘膜免疫において主たる生体防御因子である粘膜イムノグロブリン A (IgA) 抗体に着目した。IgA は粘膜表面において、病原体、毒素、アレルギーなどと結合して体外へ排除する役割を果たし、ウイルスや細菌からの感染防御、毒素の中和、抗アレルギーに重要な因子である。IgA を強く誘導する乳酸菌を選抜するため、野菜より単離した乳酸菌173株を用いてスクリーニングを行い、基準株の乳酸菌よりさらに1.5倍高く IgA を誘導する乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048株を選抜した。マウスを用いた経口投与試験によって、食餌中の乳酸菌量0.04%の低い摂取量でも、腸管粘膜上に無投与群の1.7倍の IgA を誘導できることを明らかにした<sup>1,2)</sup>。選抜した乳酸菌は現在、プロバイオティクス乳酸菌として市販されている。

## 2. プロバイオティクス乳酸菌の免疫誘導成分の解明

走査型電子顕微鏡による NTM048株の菌体観察から、宿主との接触面である本乳酸菌の最外部は、菌体外多糖に厚く覆われており、この菌体外多糖が免疫誘導に寄与していると考えられた。そこで、菌体外多糖を精製し、マウスへの経口投与試験を行ったところ、腸管粘膜上に無投与群の1.6倍量の IgA を誘導できることを確認し、免疫誘導因子は菌体外多糖であることを明らかにした<sup>3,4)</sup>。

菌体外多糖が IgA を誘導する機序を解析したところ、粘膜免疫系の初動を司る抗原提示細胞である樹状細胞から IgA 抗体を誘導する IL-6 とレチノイン酸の産生上昇<sup>5)</sup>、続いて活性化した濾胞性ヘルパー T細胞と B細胞との相互作用が認められ、このことから抗原への親和性の高い抗体が産生される T細胞

依存的誘導経路にて IgA が誘導されることを明らかとした。T細胞を介して誘導された、抗原への親和性の高い IgA (抗原特異的 IgA) は、病原体などの抗原へ強く結合することが出来るため、感染防御効果が高い(図1)。

続いてこの NTM048株が産生する菌体外多糖の分子構造の解明を試みた。*Leuconostoc*属は $\alpha$ -グルコース鎖と $\beta$ -フルクトース鎖の混在する菌体外多糖を分泌する乳酸菌として知られているが、少量混在するフルクトース鎖を NMR にて検出するのは困難で、詳細な解析はなされていなかった。我々はまず、GC-MSによる多糖構成成分の分析に続く1次元、2次元 NMR法による構造解析にて、主たる多糖構造(94%)は $\alpha$ -1,6結合の主鎖に $\alpha$ -1,3結合の側鎖を有するグルコース鎖であることを明らかにした。その後、少量のフルクトース鎖を解析するため、菌体外多糖中のグルコース鎖を酵素デキストラナーゼで分解し、得られた多糖成分の構造解析を行った。この結果、菌体外多糖中のフルクトース鎖には $\beta$ -2,6結合フルクトース鎖および $\beta$ -2,1結合フルクトース鎖が混在していることを初めて報告した。一方、グルコース鎖とフルクトース鎖の相互の結合は認められなかった<sup>6)</sup>。

## 3. 免疫誘導成分—菌体外多糖—による抗原特異的抗体の誘導

上述のように、菌体外多糖により、感染防御効果の高い抗原特異的 IgA が誘導される機序が示された。そこで、精製した菌体外多糖を用いて、その効果の確認を行った。マウスの鼻咽頭関連リンパ組織に、オボアルブミン抗原と菌体外多糖を同時に感作して、マウス生体にオボアルブミン抗原に対する特異的抗体が誘導されるか解析した。その結果、気道粘膜上に抗原特異的な IgA の誘導を確認した。さらに血中にも抗原特異的な IgG および IgA が誘導されており、粘膜免疫系とともに全身免疫系も誘導されることを確認した。アレルギーの発症につながる抗原特異的 IgE の誘導は認められなかった。この結果より本乳酸菌の菌体外多糖は、感染防御効果の高い抗原特異的抗体を誘導できる免疫誘導成分であることが明らかとなった。本知見は、粘膜から投与して粘膜上に抗原特異的な抗体を誘導する「粘膜ワクチン」の開発に必要な免疫増強剤(アジュバント)として、医薬への応用が期待できる結果であった<sup>6)</sup>。

## 4. 菌体外多糖中の免疫誘導部位の構造決定と合成法の確立

菌体外多糖を構成しているどのような構造部位が、免疫誘導部位であるかを明らかにするために、NTM048株の酵素を用いて、菌体外多糖の部分構造の合成を試みた。まず本菌のドラフトゲノム解析を行い、NTM048株は菌体外多糖を合成する酵素遺伝子を3つ有していることを明らかにした。2つは糖質加水分解酵素ファミリー70に属し $\alpha$ -グルコース鎖を合成する酵素 Gtf1, Gtf2 であり、1つは糖質加水分解酵素ファミリー68に属し $\beta$ -フルクトース鎖を合成する酵素 LvnS であった<sup>7,8)</sup>。そ

ここでこれら酵素遺伝子を乳酸菌ゲノムよりクローニングし、大腸菌に発現させて組み換え酵素を作出し、各精製酵素の性状解析により多糖合成条件を明らかにし、それぞれの酵素から菌体外多糖の部分構造を合成して、構造解析および免疫誘導活性の比較を行った。

その結果、酵素Gtf2によって合成される可溶性多糖は、最も強く抗原特異的抗体を誘導した。気道粘膜上および血中に抗原特異的なIgAとIgGを誘導し、その効果はNTM048株の菌体外多糖より、1.8~2.0倍高いものであった。酵素Gtf2によって合成される構造部位が、菌体外多糖中の免疫誘導部位であると考えられた。多糖構造解析の結果、この多糖の構造は $\alpha$ -1,6結合と $\alpha$ -1,3結合の割合が1:1のグルコース鎖であり、分子サイズ $14.4 \times 10^6$  Da、粒径 $7.8 \mu\text{m}$ であった。 $\alpha$ -1,6結合より $\alpha$ -1,3結合の割合が高いグルコース鎖、もしくは $\alpha$ -1,6結合のみのグルコース鎖の場合はいずれも活性が半分以下に低下し、グルコース鎖の結合様式の比率が活性に大きく影響することを明らかにした<sup>9)</sup>(図1)。

おわりに

科学的根拠に基づき乳酸菌の免疫誘導能を評価するには、免疫を誘導している成分の解明が重要である。我々は本研究において免疫誘導成分の構造と免疫誘導機序を明らかにし、乳酸菌を機能性食品素材として利用するための基盤を構築するとともに、酵素を用いた機能性成分の合成法を確立し、免疫増強効果を有する新たな食品素材の開発に貢献した。さらに免疫誘導機序を詳細に解析することによって、粘膜ワクチンの免疫増強剤として、医薬への利用の可能性を見出した。今後も活性の向上に向けて、さらなる研究を行う予定である。

(引用文献)

- 1) Matsuzaki, C., *et al.* Immunomodulating activity of exopolysaccharide-producing *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 from green peas. *J Appl Microbiol*, 116, 980-989 (2013)
- 2) US Patent No. 9572844, Immunostimulation agent
- 3) Matsuzaki, C., *et al.* Exopolysaccharides produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 as an immunostimulant to enhance the mucosal barrier and influence the systemic

- immune response. *J Agric Food Chem*, 63, 7009-7015 (2015)
- 4) US Patent No. 10093749, Exopolysaccharide produced by lactic acid bacteria
- 5) Matsuzaki, C., *et al.* Immunostimulatory effect on dendritic cells of the adjuvant-active exopolysaccharide from *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048. *Biosci Biotechnol Biochem*, 82, 1647-1651 (2018)
- 6) Matsuzaki, C., *et al.* Structural characterization of the immunostimulatory exopolysaccharides produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048. *Carbohydr Res*, 448, 95-102 (2017)
- 7) Ishida, R., *et al.* Levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 produces a levan exopolysaccharide with immunomodulating activity. *Biotechnol Lett*, 38, 681-687 (2016)
- 8) 松崎千秋, 乳酸菌が産生する菌体外多糖の構造と機能性, 化学と生物, 解説, 59, 7-15 (2021)
- 9) Matsuzaki, C., *et al.* Enzymatically synthesized exopolysaccharide of a probiotic strain *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 shows adjuvant activity to promote IgA antibody responses. *Gut Microbes*, 13, 1949097 (2021)

謝辞 日本農芸化学会女性研究者賞の受賞にあたり、選考委員会の先生方、関係者の方々に厚く御礼申し上げます。ここに紹介させていただいた一連の研究は、石川県立大学生物資源工学研究所にて行ったものです。未熟な研究員の頃から今に至るまで長きに渡り乳酸菌研究をご指導ご鞭撻いただきました和歌山大学山本憲二先生に心より感謝・御礼申し上げます。また女性研究者としての道を与え、いつも温かく支えてくださり、本賞へのご推薦を賜りました石川県立大学熊谷英彦先生に、深く御礼申し上げます。共同研究において免疫学・生化学における研究手法を惜しみなくご教授くださった医薬基盤・健康・栄養研究所國澤純先生、細見晃司先生、滋賀大学糸乗前先生、Noster株式会社久景子研究員に深謝申し上げます。最後に、データのディスカッションを通して時には厳しく、時には親身になってこれまでの研究生活を支えていただきました河井重幸先生、南博道先生、中川明先生、松本健司先生、東村泰希先生をはじめとする石川県立大学生物資源工学研究所および食品科学科の先生方に心より御礼申し上げます。

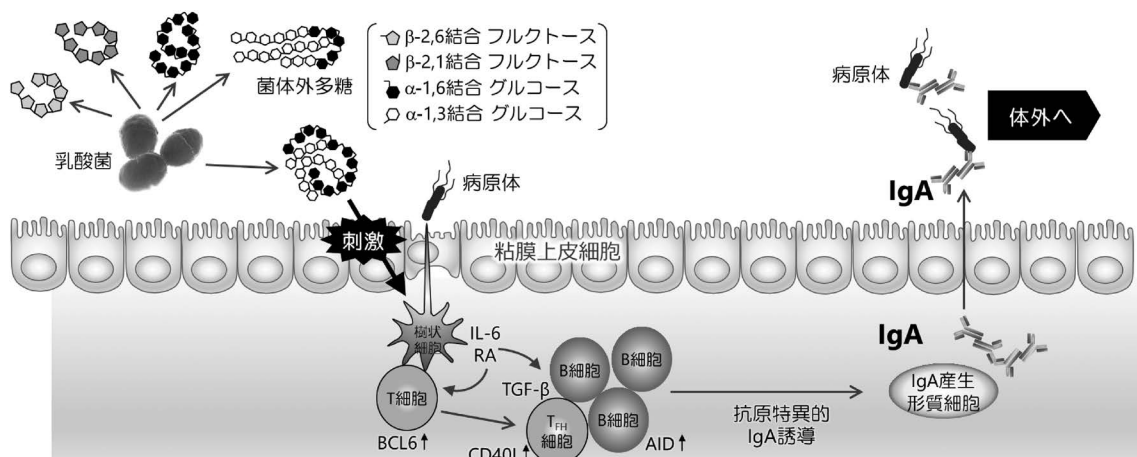


図1. *L. mesenteroides* NTM048株の分泌する菌体外多糖成分の中でも、 $\alpha$ -1,6結合と $\alpha$ -1,3結合の割合が約1:1のグルコース鎖は、樹状細胞を刺激し、IgA産生を誘導するサイトカインIL-6とレチノイン酸(RA)の産生を促進する。また濾胞性ヘルパーT細胞( $T_{\text{FH}}$ 細胞)を介したT細胞依存的抗体産生経路にて、病原体を排除する効果の高い抗原特異的なIgAの分泌を促進する。