

# 論文内容要旨

植物乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* SN35N の全ゲノム  
解析と本菌株に特異的な細胞外多糖体の構造と機能

主指導教員：杉山 政則 教授

(医歯薬保健学研究科 未病・予防医学)

副指導教員：小池 透 教授

(医歯薬保健学研究科 医薬分子機能科学)

副指導教員：熊谷 孝則 准教授

(医歯薬保健学研究科 微生物医薬品開発学)

白神 聖也

(医歯薬保健学研究科 薬科学専攻)

乳酸菌は醗酵食品の製造に利用されており、食品に対する保存期間の延長や食感や風味などの付加価値を高めるのに役立っているほか、健康サプリメントや整腸剤としても用いられている。近年、腸内細菌叢と様々な疾病や免疫力との間に密接な関係があるとの議論が活発になされている。そのような背景の中で、人体への乳酸菌の摂取が腸内細菌叢の改善に有益であるとの可能性に注目が集まっており、乳酸菌の未病・予防医学への利用が期待されている。

乳酸菌は分離源の違いによって、動物由来乳酸菌（動物乳酸菌）と植物由来乳酸菌（植物乳酸菌）とに大別できる。乳酸菌のなかには細胞外へ多糖体（exopolysaccharide: EPS）を産生する菌株が見出されており、近年は EPS が有する生理活性が注目されている。植物乳酸菌とその EPS が期待される注目点としては、難消化性のため消化管上部では分解されずに大腸まで移行し、EPS がビフィズス菌の栄養源となるプレバイオティック（prebiotic）効果であり、2つ目は免疫システムを賦活化（活性化）する効果である。さらなる EPS の基盤研究が、新たな EPS の保健機能性の発見につながるものと推察される。

以前、当研究室において梨から分離した植物乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* SN35N も EPS を産生する。そこで、本研究では、SN35N が産生する EPS の化学構造および機能を解析することを目的とした。さらに、本菌株の EPS 生合成に関与する遺伝子クラスターを明らかにするため、本菌株の全ゲノム解析をめざした。

本研究を実施した結果、SN35N 株の産生する EPS の分子量は約  $2.5 \times 10^6$  であることがわかった。乳酸菌種によっては、酸性 EPS と中性 EPS を同時に産生する株も知られているが、SN35N 株は酸性 EPS のみを産生していた。この酸性 EPS の構成糖として、グルコース、ガラクトース、マンノースが検出され、その存在比率は、それぞれ、14.3 : 5.7 : 1 であった。このように、SN35N 株由来の EPS はグルコースの占める割合が高いのが特徴である。また、その酸性はリン酸基によるものであることが判明した。

次に、全ゲノムの塩基配列を解析した結果、SN35N 株の染色体は環状構造をとることが示された。その全塩基対数は 3,267,626 bp であり、GC 含量は 44.51%、推定遺伝子数は 3,146 であった。さらに、この菌株には 4 つのプラスミド (pSN35N-1, -2, -3, -4 と命名) を保有することもわかった。SN35N 株の EPS 生合成遺伝子クラスターは、染色体 DNA 上に 4 個存在 (*lpe1*, *lpe2*, *lpe3*, *lpe4* と命名) し、更なる 1 つ (*lpe5*) はプラスミド (pSN35N-3 と命名) に存在した。pSN35N-3 プラスミドの塩基対数は 35,425 bp であった。次に、SN35N 株を親株として、プラスミド脱落実験用の試薬として使用されるノボピオシン処理により、EPS をほとんど産生しない変異株を取得した。その結果、本変異株は *lpe5* 遺伝子を失っていたことから、SN35N 株の産生する EPS に大きく関与する生合成遺伝子は pSN35N-3 プラスミド上に存在する *lpe5* であ

ることが示唆された。

SN35N 株が産生する酸性 EPS の機能性を調査した結果、EPS はヒアルロニダーゼ阻害活性を示し、その IC<sub>50</sub> 値はかなり低いことがわかった。この酸性 EPS におけるヒアルロニダーゼ阻害活性は、当研究室においてタイ国のトロピカルフルーツから分離された好温性乳酸菌 (thermophilic lactic acid bacteria) である *Lb. amylovorus* PY45 および *Pediococcus pentosaceus* LY45 が産生する EPS や褐藻類由来のフコイダンよりも強く、既存の抗炎症剤として使用されているクロモグリク酸ナトリウムやグリチルリチン酸ジカリウムの IC<sub>50</sub> 値と同程度の値を示した。ヒアルロニダーゼ活性阻害 IC<sub>50</sub> 値とヒスタミンの放出阻害との間に正の相関があることから、SN35N 株由来の酸性 EPS は抗炎症剤として利用できる可能性が示唆された。

また、SN35N 株の安全性試験を実施した結果、急性毒性試験と変異原性試験ともに陰性を示した。さらに、既に製品化されている SN35N 株を利用した醗酵食品（ヨーグルトやその他の乳酸菌飲料）の食経験から、本菌株の安全性は担保されている。したがって、*Lb. plantarum* SN35N は、プロバイオティクス (probiotics) およびバイオジェニクス (biogenics) として十分期待できる。