

学位論文

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

2018

主指導教員 杉山 政則 教授  
副指導教員 小池 透 教授  
熊谷 孝則 准教授

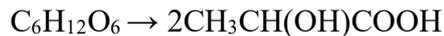
広島大学大学院医歯薬保健学研究科  
博士課程後期（薬科学専攻）  
白神 聖也



## 【序 文】

「乳酸菌」という呼称は分類学用語ではないが、真正細菌群に位置づけられるこの微生物は、嫌氣的条件下でのエネルギー獲得のため、1分子のグルコースから、1分子もしくは2分子の乳酸を生成させる。乳酸菌は、細胞壁構成成分としてペプチドグリカン層を有する、カタラーゼ陰性のグラム陽性細菌であり、運動性と芽胞形成機能を持たない。生育にナイアシンを必要とし、染色体DNAのGC含量はAT含量に比べて低い。ちなみに、乳酸発酵の様式は、乳酸菌の属(genus) や種(species) により異なり、以下の3通りがある。

### ① ホモ型乳酸発酵



### ② ヘテロ型乳酸発酵 (2 様式) : 乳酸以外にエタノールもしくは酢酸を産生



例えば、*Lactobacillus (Lb.) casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius*, *Lb. bulgaricus* などはホモ型乳酸発酵を行うが、*Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchnerii*, *Lb. cellobiosus* などは、ヘテロ型乳酸発酵を行う[1]。現在、工業的に乳酸を製造する場合は、糖からの収率が高いという理由で「ホモ型乳酸発酵」を行う乳酸菌が活用される。

乳酸は、その分子内に不斉炭素1つが存在するため、D-乳酸とL-乳酸の異性体が存在するが、*Lactobacillus* 属 や *Streptococcus* 属の菌株によるホモ型乳酸発酵様式ではL-乳酸のみが生成する。近年、生分解性プラスチックとして注目されているポリ乳酸の製造のために、光学純度の高い乳酸の需要が高まり、乳酸発酵によるL-乳酸の大量生産が行われている[2]。ちなみに、ビフィズス菌のなかまである *Bifidobacterium* 属や乳酸菌のなかまの *Leuconostoc* 属は常にヘテロ型乳酸発酵様式をとる。

ところで、乳酸菌はその生育環境の違いにより、動物由来乳酸菌（以下、動物乳酸菌）と植物由来乳酸菌（以下、植物乳酸菌）の2グループに分けられる。動

物乳酸菌は、動物の腸管内や口腔内に存在し、ヨーグルト、チーズ、乳酸菌飲料などの製造に活用されている。

一方、植物乳酸菌は、キムチ、漬物、味噌などの発酵食品の製造に利用されてきた。当研究室では、野菜や果物の葉や茎、花、果皮のほか、穀物、薬用植物などから多くの植物乳酸菌を探索分離してきた。植物乳酸菌は動物乳酸菌と比べ、胃酸や胆汁酸に対してより強い耐性を示すことから、生きたまま腸に届きやすい。棲息環境から判断すると、植物乳酸菌は動物乳酸菌に比べ、栄養源が乏しい環境中で生育しており、また植物にはアルカロイドやタンニンなどの抗菌成分もあり、競合微生物も多いことから、植物乳酸菌は厳しい環境に耐えることができると考えられる[3]。また、当研究室で分離した植物乳酸菌のなかには、整腸作用や肝機能改善効果のほか、コレステロールの蓄積抑制作用、GABA ( $\gamma$ -アミノ酪酸) 産生能、バクテリオシン (bacteriocin) 産生性、抗ヘリコバクター・ピロリ活性、腐敗細菌・虫歯 (齲蝕) 菌・食中毒細菌などに対する抗菌作用などの機能性を持つ乳酸菌が見つかっている。また、筆者の所属する研究グループでは、腸管内のパイエル板に存在する B 細胞による IgA の産生を促進する植物乳酸菌 *Enterococcus avium* G-15 をニンジンの葉から分離している。韓国や日本をはじめとするアジア地域では、歴史的に植物由来の乳酸菌を利用した発酵食品が多いことから、これら醗酵食品からも多くの特徴的な植物乳酸菌が見つかる可能性がある [4-12]。

「適切な量を摂取したとき、宿主の健康に有益な働きをする生きた微生物」をプロバイオティクス (probiotics) [13] と呼び、乳酸菌は代表的なプロバイオティクスの 1 つである。乳酸菌は、食生活と関わりが深く、古来から食品の風味付けや長期保存食の製造に利用されてきた。20 世紀の初め、パリ・パストゥー研究所のメチニコフは、ヨーグルトを習慣的に摂取するブルガリアのある村には長寿の人が多くことに着目し、「乳酸菌の摂取が腸内腐敗菌を抑制し、健康維持と疾病を予防する」という「ヨーグルト不老長寿論」を提唱した。また、カスピ海沿岸に住む人もヨーグルトを摂取し、彼らは健康長寿であることも知られている [14-19]。これはプロバイオティクスの摂取が健康に良い影響を与えるとの考え方につながるが、ヨーロッパにおいて、ヨーグルト製造に利用される *Lb. bulgaricus* が腸管内に棲みつけないことがわかってからは、この説は、一時、歴史に議論されない時期があった。20 世紀後半、再び乳酸菌の健康維持への有用性が注目され、プロバイオティクスとしての乳酸菌の研究が盛んになった。現在では、上述したように、プロバイオティクスは、「適切な量を摂取したとき、宿

主の健康に有益な働きをする生きた微生物」と定義されているが、歴史的には、以下のように少しずつ変化して現在に至っている。1989年、Fullerにより、まず、「腸内細菌のバランスを改善して、健康に有益な働きをすることが保証された微生物」と定義された[20]。その後、「宿主の健康や栄養に有意に働く生菌剤または培養乳製品」(1996, Salminen) となり[21]、現在は、「適切な量を摂取したとき、宿主の健康に有益な働きをする生きた微生物」をプロバイオティクス (probiotics) と定義している [13]。

乳酸菌の特定株は、USAにおいて GRAS (General Recognized As Safe) として、ヒトに対し安全性の高い微生物として認められており、人体への副作用はこれまで観察されていない[22, 23]。プロバイオティクスとして、これまで乳酸菌は、ヨーグルト、チーズ、乳酸菌飲料のほか、健康サプリメントや医薬品としても使われており、多くの食品企業や医薬品業界が乳酸菌の保健機能性に注目している。

当研究室では、乳酸菌を未病、予防医学、ならびに創薬に活用すべく、ニンジンの葉、壬生菜、キムチ、伊予柑や温州ミカンの果実、ロンガン、マタタビの花など、植物の葉、花被や果実などに存在している植物乳酸菌の探索分離とその保健機能性研究を推進している[24-26]。

ところで、乳酸菌のなかには細胞外へ多糖体を分泌する菌株がいる。この細胞外多糖体を exopolysaccharide (EPS) と呼び、キノコや海藻などにも EPS が含まれている。細菌のつくる EPS は、細胞構造を保護をしたり、栄養の運搬や外敵を攻撃する役割を持つことが考えられる。ちなみに、虫歯の起因菌 *Streptococcus mutans* の産生する不溶性グルカンが細胞外多糖体の一種であり、その構造体に細菌などが付着したものを、特にバイオフィーム (Biofilm) と呼んでいる。

乳酸菌の産生する EPS は、化学構造的に2つのタイプに大別できる。1つはホモ型多糖体、もう1つがヘテロ型多糖体である。ホモ型多糖体は、1種類の単糖の繰り返し単位で構成される。他方、ヘテロ型多糖体は、少なくとも2種類の単糖から構成されている。乳酸菌の産生する EPS の化学構造は、菌種間だけではなく、菌株間でも異なることが報告されている。例えば、*Lb. plantarum* C88 や *Lb. bulgaricus* NCFB2074 が産生する EPS は、ガラクトースとグルコースから構成される。一方、*Lb. johnsonii* 151 の産生する EPS は、構成糖は同じだが、その構成比が異なっている。ちなみに、この2種類の糖を持つこと及び酸性 EPS であることが、免疫賦活機能に関係するものと考えられている[27, 28]。

乳酸菌の産生する EPS には、血清中の中性脂肪やコレステロールを低減化させる機能のほか、NK 細胞の活性化による免疫賦活機能、潰瘍抑制機能、抗インフルエンザウイルス活性、抗菌作用などの機能性が見出されている。生きた乳酸菌体のみでなく、乳酸菌により産生される EPS にも健康維持機能や予防医学に対し有益な機能性のあることがわかってきた。筆者の所属する研究室では、これまで、植物乳酸菌やその EPS の構造や機能の基礎データを集積し、EPS の保健機能性研究を推進してきた[1, 29-38]。その一部を Table 1 に示す。

**Table 1. 当研究室保存の機能性植物乳酸菌株の一部とその菌株の特徴 [39-42]**

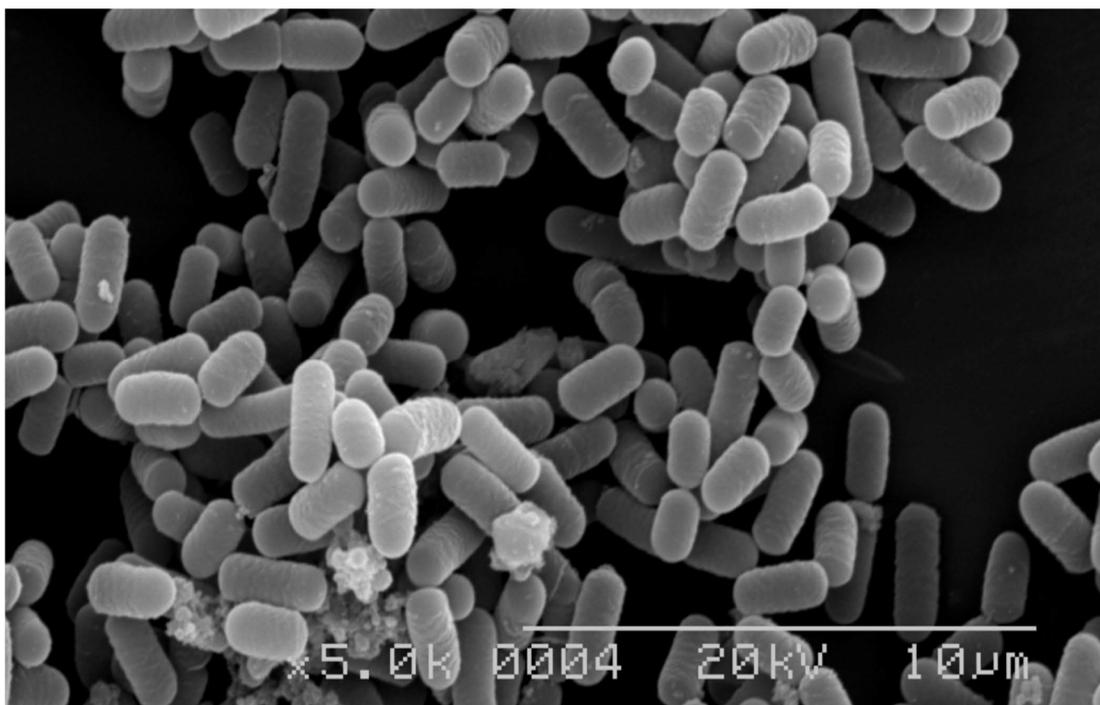
植物乳酸菌の分離株	特 徴
<i>Lactobacillus plantarum</i> SN13T	抗ピロリ, 肝機能数値改善, 整腸作用
<i>Lactobacillus plantarum</i> SN35N	抗ピロリ, 整腸作用, 多糖類産生
<i>Enterococcus avium</i> G-15	GABA 産生
<i>Enterococcus mundtii</i> 15-1A	バクテリオシン産生
<i>Lactobacillus brevis</i> 925A, 174A	バクテリオシン産生
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LP28	多糖類産生, 脂肪蓄積抑制
<i>Lactobacillus sakei</i> BM55-1	抗菌タンパク質産生
<i>Lactobacillus reuteri</i> BM53-1	バイオフィーム形成抑制, TSST-1 産生抑制

ところで、最近の乳酸菌の機能性研究は、単なる整腸にとどまらず、脂質異常症、糖尿病、高血圧、高尿酸血症などの生活習慣病の予防改善をターゲットとしている。そのほか、慢性胃炎、胃潰瘍、胃癌の発症に深く関係するピロリ菌の除菌に有効な乳酸菌、潰瘍性大腸炎やクローン病の自己免疫疾患の予防改善に寄与する乳酸菌、さらには歯周病や虫歯を予防できる乳酸菌の探索分離も行われている。

筆者の所属する「未病・予防医学共同研究講座」では、インフルエンザやノロウイルスの感染予防に有効な植物乳酸菌の探索分離を研究テーマの 1 つとして掲げ、ごく最近、その乳酸菌株の分離に成功した。ウイルス感染症や生活習慣病を始めとする疾病の予防改善に有効な乳酸菌は、特定保健用食品（トクホ）、栄養機能性食品、栄養補助食品（サプリメント）、さらには医薬品にも応用できる可能性を秘めている。さらに、当研究室では、酒粕を植物乳酸菌の特定株を用い

て二次発酵させると、保湿性の高い化合物が生成することや皮膚細胞組織の代謝機能が活性化することを見出し、それを基にコスメトロジー分野での実用化がなされている。ごく最近、他の研究グループにより、カイコの繭を基に作られる繊維の開発に乳酸菌を応用しているとの報告がなされている[1, 24, 25, 43, 44]。

本研究の目的は、梨から分離した乳酸菌 *Lb. plantarum* SN35N (Fig. 1) を研究材料として、その菌株の産生する EPS の種類と構成糖を解析し、かつ、その保健機能性を調査するとともに、SN35N 株の全ゲノム情報を解読することにより、本菌株の EPS 生合成遺伝子クラスターを解明することである。



**Fig. 1** *Lb. plantarum* SN35N の走査型電子顕微鏡写真

# 【第 I 章】細胞外多糖体の分析

## 第 1 節 SN35N 株の培養および細胞外多糖体 (EPS)の産生ならびに その精製

### 1. SN35N 株の培養

Modified SDM[45, 46]に, SN35N 株を植菌して培養した後, EPS を産生させた。Vitamine 溶液 2 mL/L と微量金属溶液 1 mL/L (実験の部参照) および SN35N 株の前培養液 1 mL/L を 1 L の密閉容器に入れ, 合計で 5 つの容器 (約 5 L) を 28 °C のインキュベーターにて 3 日間静置培養した。

それぞれを目視したところ, 濁りが認められ, SN35N 株が十分に増殖したことが確認できた。

### 2. 乳酸菌の EPS の抽出

【実験の部】の実験 3 に示す方法で行った。EPS 以外を除去して, SN35N 株の EPS が抽出できた。

### 3. 中性 EPS と酸性 EPS の分離

【実験の部】の実験 4 のとおり, 陰イオンオープンカラム交換クロマトグラフィーを行った。まず, 最初に中性 EPS を分取し, 次に buffer に NaCl を加えることで, 酸性 EPS を分取した。酸性 EPS は効率よく抽出できたが, 中性 EPS はほとんど抽出できなかった。フェノール硫酸法[47]により, 糖の存在を確かめた。

#### 4. 吸光度測定による糖の量の相対的確認

上の3で分画した100本のfractionについて、1~40の中性EPSと41~100の酸性EPSに分けて、96穴プレートに、それぞれ5%フェノール40 $\mu$ L、分画液40 $\mu$ Lにconc.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を200 $\mu$ L注いで反応させ、吸光マイクロプレートリーダーで吸光度測定(490 nm)を行った。吸光度測定の結果をグラフで示す(Fig. 2)。

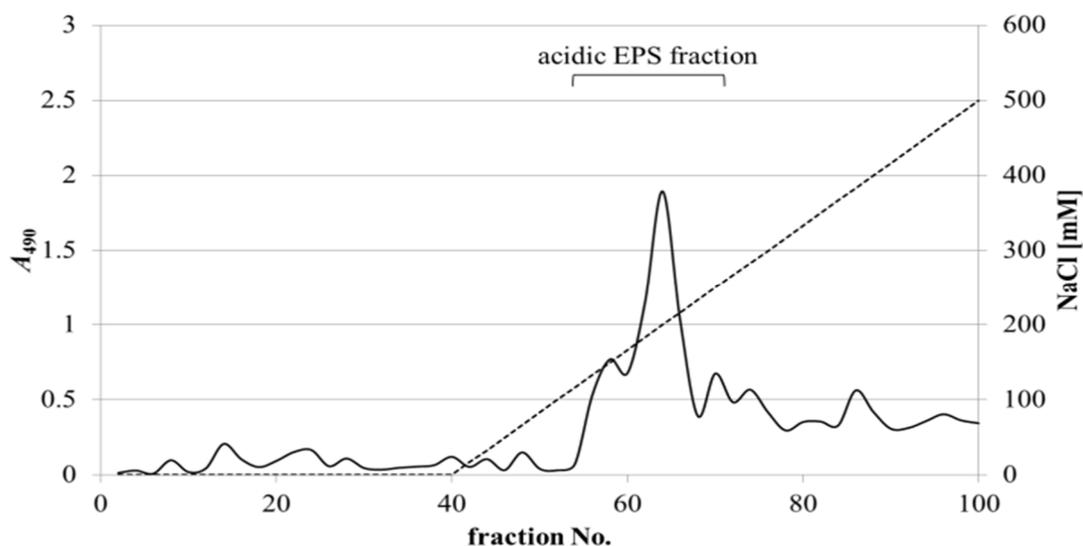


Fig. 2. 陰イオン交換カラムによるSN35N株由来EPSの分画

糖の検出はフェノール硫酸法により行い(実線)、NaClの直線濃度勾配により溶出させた(破線)。

Fig. 2に示すように、中性EPSを示すピークはほとんど検出されず、実際の凍結乾燥操作でも中性EPSはほとんど得られなかった。この結果から、SN35N株の産生するEPSの大部分は酸性EPSであると示唆された。

## 第2節 EPSの構成糖の解析

### 1. 分子量の測定

酸性EPSの分子量は、分子量分析用カラムKS806を使用して分析した。標準物質としてプルランを用いて作成した検量線 (Fig. 3, Table 2) からEPSサンプルの分子量を算出した。

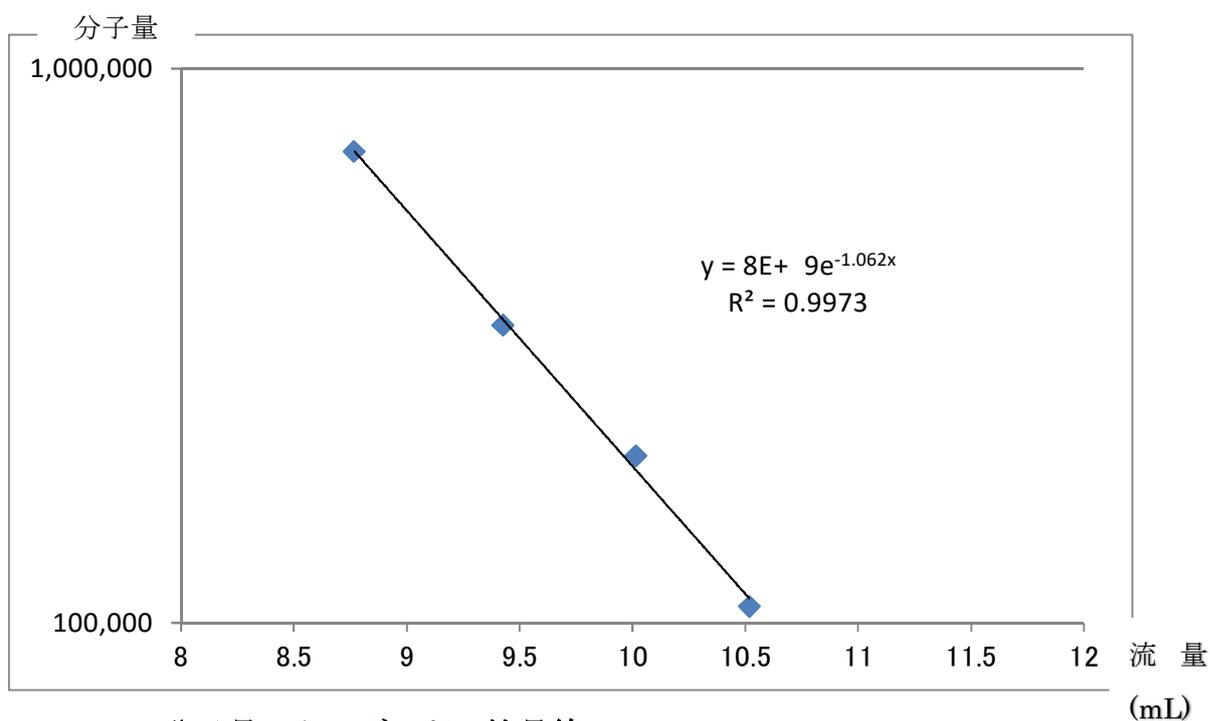


Fig. 3. 分子量スタンダードの検量線

Table 2. スタンダードの分子量とリテンションタイムの関係

スタンダード	リテンションタイム(min.)	流量 (mL)	分子量
p100	15.025	10.5175	107,000
p200	14.308	10.0156	200,000
p400	13.467	9.4269	344,000
p800	12.525	8.7675	708,000

【実験の部】に記載のように、糖分析用カラムを用いたHPLCゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分析した。溶出液はRI検出器でモニターした (Fig. 4, 5)。

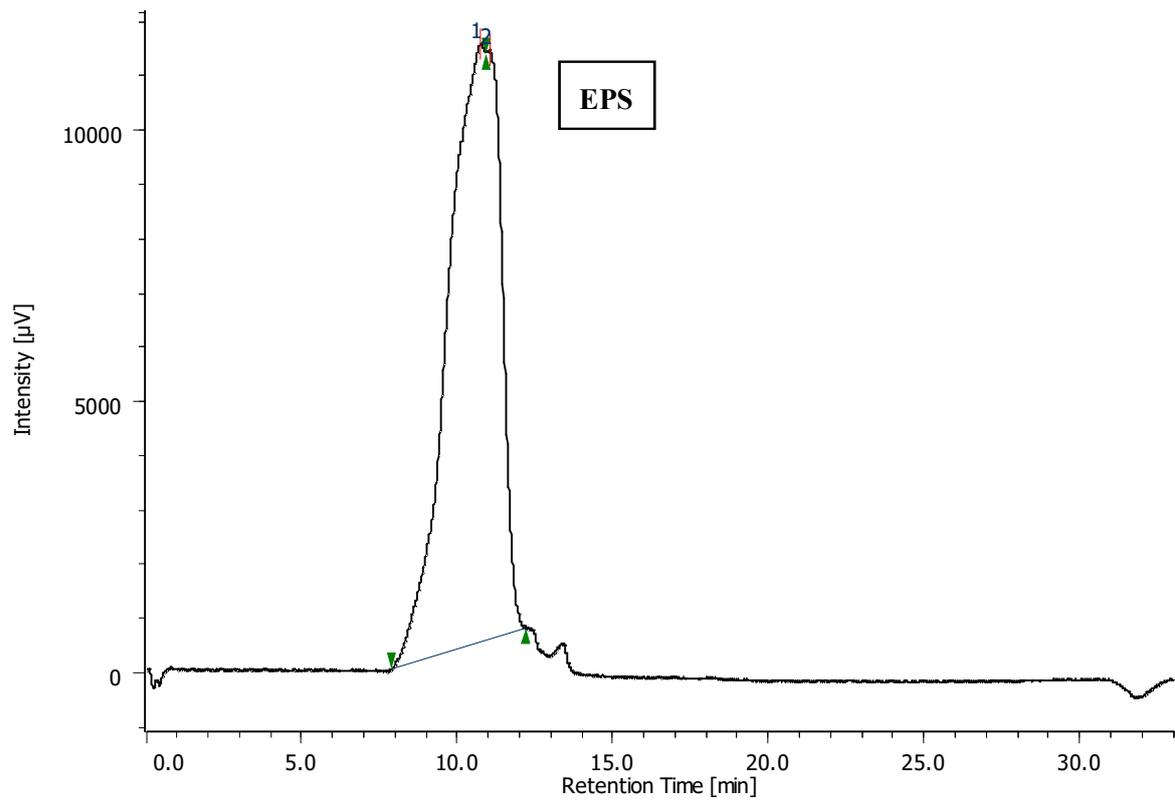


Fig. 4. 酸性 EPS の分子量測定 (1)

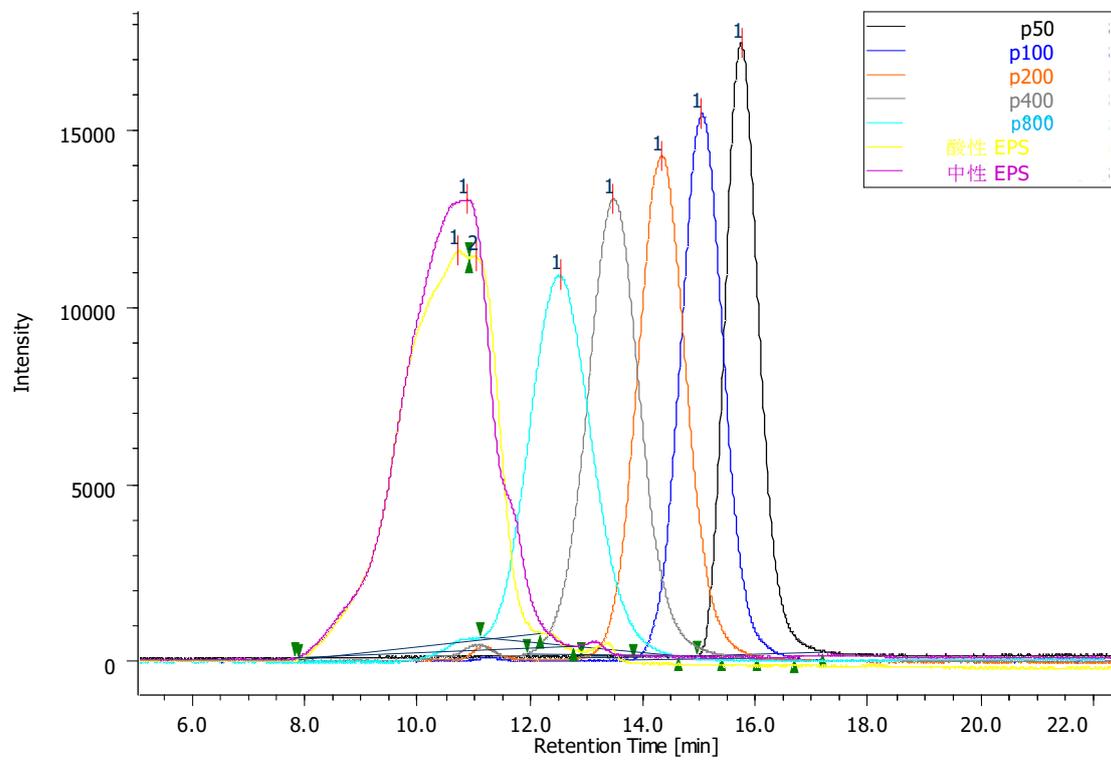


Fig. 5. 酸性 EPS の分子量測定 (2)

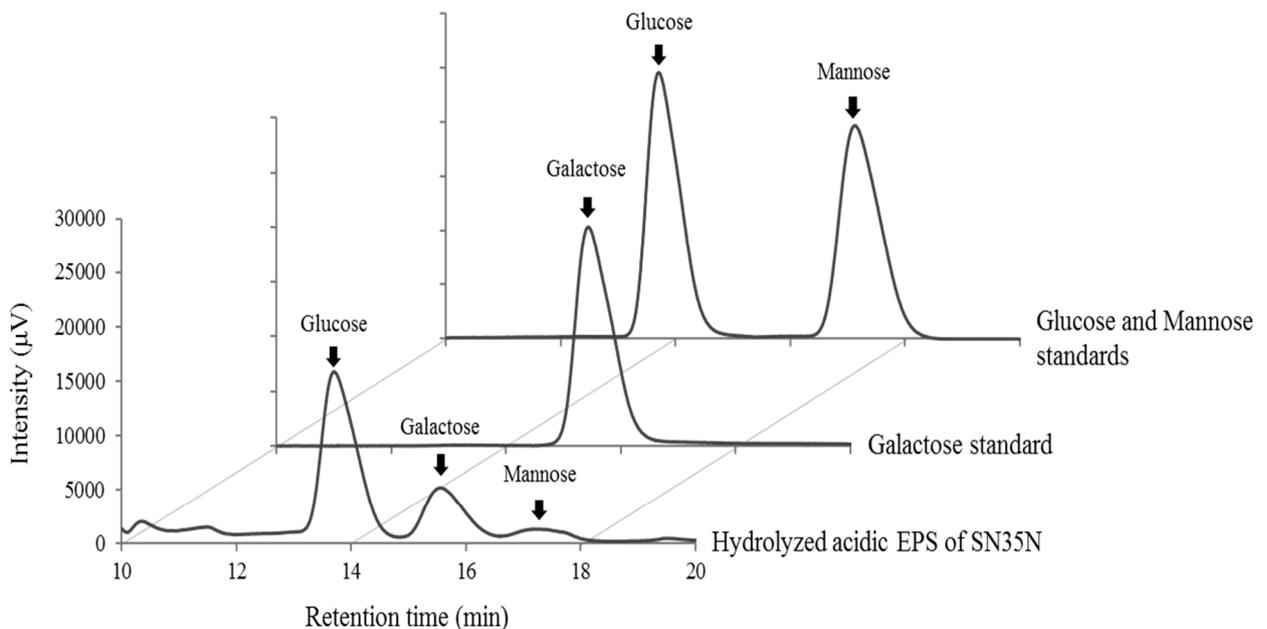
**Table 3. 酸性 EPS の推定分子量**

サンプル		リテンション タイム (min.)	流量 (mL)	分子量	分子量 (概数)	平均
酸性 EPS	解析 1	10.692	7.4844	2,825,722	283 万	250 万
	解析 2	11.025	7.7175	2,206,068	221 万	

スタンダードを用いた較正カーブから酸性 EPS の分子量を求め計算した結果、2 回の測定の前平均から、酸性 EPS の分子量は約  $2.5 \times 10^6$  であると推測した。

## 2. 酸性 EPS における構成単糖の分析

酸性 EPS を構成する単糖類の組成は、酸加水分解法により分析した。110 °C で 3.5 時間、加水分解後に、0.45 μm 孔の膜濾過器で濾過した。酸性 EPS とスタンダードを HPLC SUGAR SP0810 カラムを用い、蒸留水を 0.7 mL/min の速度で流しながら分析した。カラム・オープン温度は 80 °C とし、溶出液を RI 検出器でモニターした (Fig. 6)。



**Fig. 6. SN35N 株由来酸性 EPS の HPLC による構成糖の検出**

各単糖のピークはそれぞれのスタンダードのものと保持時間の一致により確認した。

Retention time	グルコース	13.70 (min.)
	ガラクトース	15.55 (min.)
	マンノース	17.21 (min.)

また、酸加水分解後の酸性 EPS 中の単糖の濃度は Table 4A のようになった。

**Table 4A. 本 EPS 中の単糖の濃度**

酸性 EPS 分取量	加水分解後 回収量	液中のグルコース量	液中のガラクトース量	液中のマンノース量
0.2021 (g)	19.846 (g)	0.06316 (g)	0.02399 (g)	0.00420 (g)
		グルコース濃度	ガラクトース濃度	マンノース濃度
濃度 (%)		<b>0.318 (%)</b>	<b>0.121 (%)</b>	<b>0.021 (%)</b>

**Table 4B. 本 EPS 中の単糖の構成比**

サンプル	単糖構成比			サンプル中の 糖含量
	グルコース	ガラクトース	マンノース	
酸性 EPS	<b>1</b>	<b>0.38</b>	<b>0.07</b>	<b>40.7 (%)</b>
(mol 比)	<b>14.3</b>	<b>5.7</b>	<b>1</b>	

酸性 EPS の構成単糖は、グルコース : ガラクトース : マンノース = **14.3 : 5.7 : 1 (mol 比)** であることがわかった (Table 4B)。

### 3. 酸加水分解法による酸性基の検出

酸性基がリン酸基であることを確かめるために、BIOMOL グリーン試薬 (バイオモル社) を使用した。酸性 EPS を蒸留水に溶かし、0.02% (w/v) となるよう調製した。EPS 溶液 5 mL と 40 g/L の  $K_2S_2O_8$  1 mL を混ぜ合わせた後に、混合物を 30 分間 120 °C で加熱した後、室温で冷却した。加熱しないサンプルと蒸留水を control として使った。

蒸留水で 4 倍, 10 倍, 20 倍に希釈したサンプル 100  $\mu$ L と 1 mL の BIOMOL グリーン試薬を混ぜ、25 分間、室温で反応させた後に、620 nm の吸光度を測定することで、リン酸の遊離を確認した。リン酸の量は、80~5  $\mu$ M の連続 2 倍希釈により調製したリン酸溶液により作成した検量線 (Fig. 7) を基に求めた。

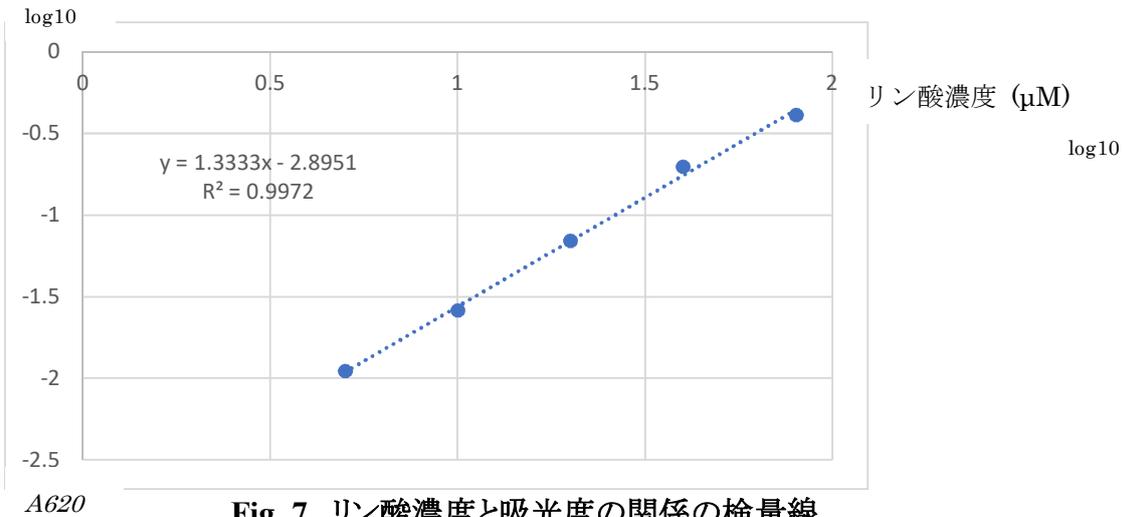


Fig. 7. リン酸濃度と吸光度の関係の検量線

Table 5. 酸性 EPS の吸光度 (620nm) とリン酸濃度換算

	希釈	吸光度	log10	logX 計算	X 換算	倍率修正
サンプル	×1	0.718	-0.1439	2.06339	115.71	
	×4	0.244	-0.6126	1.71184	51.504	206.01
	×10	0.074	-1.1308	1.32322	21.049	210.49
	×20	0.027	-1.5686	0.99482	9.8815	197.63

平均 204.71(μM)

その結果, Table 5 のように, 0.02% (w/v) の酸性 EPS を酸加水分解して得られた反応液中の遊離リン酸の濃度は約 204.7 μM であり, 本株が産生する酸性 EPS に対しては約 1.02 μmol/mg の割合でリン酸が結合していることが推定された。したがって, 本株の産生する酸性 EPS は, リン酸基の存在により酸性を示していることが考えられた。

リン酸基修飾が見られる乳酸菌の EPS としては, *Lb. bulgaricus* OLL1073R-1 (Meiji R1 ヨーグルトで利用), *Lactococcus (Lc.) lactis* subsp. *cremoris* FC (カスピ海ヨーグルトで利用) などが知られている [8, 48]。 *Lb. bulgaricus* OLL1073R-1 は NK 細胞の活性を高め [5], *Lc. lactis* subsp. *cremoris* FC にはインフルエンザウイルスの感染抑制効果があることが報告されている [8, 49]。また, *Pediococcus (P.) pentosaceus* LP28 はピルビン酸修飾の酸性 EPS を産生する [50]。



## 【第Ⅱ章】 EPS の機能性評価

### 第1節 緒言

乳酸菌 *Lb. gasseri* LG21 を用いたヨーグルトは、序文で記載したように抗ヘリコバクター・ピロリ活性を持っている。当研究グループでは、特定の果汁を培地として、*Lb. plantarum* SN13T を培養すると、その培養液上清中に抗ピロリ活性物質を産生することを見出した[1]。また、梨から分離された乳酸菌 *Lb. plantarum* SN35N および *Lb. plantarum* SN13T の両菌株を用いて製造したヨーグルトが便秘の改善と  $\gamma$ -GTP を有意に下げることを見出した[35]。他方、別の研究グループにより、*Lc. lactis* subsp. *cremoris* FC [8, 49]、*Lb. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* OLL1073R-1 の産生する EPS は、抗インフルエンザウィルス活性を持つことが報告されている[5, 53]。

一方、当研究室の Panthavee らにより、*Lb. amylovorus* PY45 や *P. pentosaceus* LY45 の産生する EPS にはヒアルロニダーゼに対する阻害作用のあることが報告されているほか、*Pediococcus* 属乳酸菌の特定株の産生する EPS がヒアルロニダーゼ活性を阻害することも見出されている[54, 55]。本章では、SN35N 株の産生する酸性 EPS の機能性の1つとして、ヒアルロニダーゼ活性の阻害の有無を調査した。

ヒアルロン酸は、組織を構成する細胞間に存在する物質で、水分維持やクッションなどの役割を果たしている。ヒアルロニダーゼ (hyaluronidase : EC 3.2.1.35) は、ヒアルロン酸を分解する酵素であり、炎症時に活性化され、組織の構造を破壊し炎症を引き起こす[56, 57]。ヒアルロニダーゼが機能すると、細胞組織の浸透圧が上がり、吸水しやすくなる一方で、皮膚細胞の老化にもつながる。近年、ヒアルロニダーゼの触媒活性の抑制は、IgE が媒介するマスト細胞からのヒスタミン放出の抑制と正の相関があることがわかってきた[58, 59]。したがって、ヒアルロニダーゼに対する阻害物質は、抗炎症剤として利用できる可能性が高い。そこで、SN35N 株により産生される酸性EPSの機能性評価項目の1つとして、ヒアルロニダーゼの阻害強度を測定することとした。

## 第2節 ヒアルロニダーゼに対する阻害活性

ヒアルロニダーゼ活性の評価は、Fujitani らの方法[60]を用いて行った。

まず、EPS に酢酸ナトリウム buffer を加えて pH 4.0 に調整した。それに、4 mg/mL の ヒアルロニダーゼを入れて 37 °C の溶液を作製した。

その溶液に、ヒアルロン酸を加えた。EPS は蒸留水 10  $\mu$ L 中に段階希釈して調製し、ヒアルロニダーゼの阻害活性を調べた。

ヒアルロニダーゼを含まない溶液を control として使い、ヒアルロニダーゼ活性の抑制率 (%) を、下の方程式を用いて算出した。ヒアルロニダーゼ残存活性は、585nm 吸光度を測定して求めた (Table 6)。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 - (s/C) \times 100 \quad (s: \text{sample} \quad C: \text{control})$$

\* s (サンプル) は EPS 試料ありのヒアルロニダーゼ活性を意味し、C (control) は EPS 試料なしのヒアルロニダーゼ活性を意味する。

**Table 6.** SN35N 由来の酸性 EPS による残存活性とヒアルロニダーゼ阻害活性 (2 回の平均値)

EPS 濃度 ( $\mu$ g/mL)	0	120	240	360	480	600	720	840	960	1080	1200
残存活性 (%)	100	87.9	48.0	28.8	18.2	10.6	9.11	10.6	8.57	8.02	6.38
抑制率 (%)	0	12.1	52.0	71.3	81.8	89.4	90.9	89.4	91.4	92.0	93.6



## 【第Ⅲ章】 EPS 生合成遺伝子クラスターの解析

### 第 1 節 SN35N 株の全ゲノム解析

SN35N 株の全ゲノム配列を解読した結果, 全塩基対の長さは 3,267,626 bp で, GC 含量が 44.51%の環状 DNA であることがわかった。ちなみに coding sequence (CDS) の数は 3,146 であった。DDBJ に登録されている 8 株の *Lb. plantarum* と比較すると (Table 7), 他の *Lb. plantarum* 各株のゲノムの GC 含量は 44.36%, CDS 数は 3,057 であった。*Lb. plantarum* 各株のゲノムサイズを比較してみると, 2.9 Mb から最大で 3.4 Mb と, 同じ種でも, かなりの長さの違いが認められる [61]。

Table 8. *Lb. plantarum* 各株のゲノム比較

Strain	Genome size (bp)	GC content (%)	CDS	tRNA genes	rRNA genes	Isolation origin	Accession no.
SN35N	3,267,626	44.5	3,146	75	16	pear	AP018405
WCFS1	3,308,273	44.5	3,013	70	15	human saliva	NC_004567
JDM1	3,197,759	44.7	2,904	61	16	human intestinal tract	NC_012984
ZJ316	3,203,964	44.4	2,894	61	15	healthy newborn fecal sample	NC_020229
16	3,044,678	44.7	2,784	66	16	malt production steep water	NC_021514
B21	3,284,260	44.5	3,021	63	17	Vietnamese fermented sausage (nemchu	NZ_CP010528
HFC8	3,067,675	44.3	2,766	68	16	faecal sample	NZ_CP012650
KP	3,418,468	44.3	3,184	81	16	whole fly	NZ_CP013749
DF	3,423,963	44.4	3,204	81	16	whole fly	NZ_CP013753

さらに, BLAST プログラムを用いた相同性検索の結果, SN35N 株は 5 つの EPS 生合成クラスターを保有していると推測されたことから, それらを *lpe1*, *lpe2*, *lpe3*, *lpe4*, *lpe5* と命名した。それらのうち, *lpe1*–*lpe4* までの 4 つの遺伝子クラスターは, 染色体 DNA に存在し (Table 9, Fig. 11), *lpe5* はプラスミド DNA にあることがわかった。

**Table 9. *Lb. plantarum* SN35N 株の EPS 生合成遺伝子クラスター**

Cluster and gene	Size (aa)	Location	Predicted function	Best BLAST match	Source organism
<b><i>lpe1</i> cluster</b>					
<i>lpe1A</i>	323	593342–594313 C	Glycosyltransferase	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe1B</i>	390	592170–593342 C	CDP-glycerol--glycerophosphate glycerophosphotransferase	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe1C</i>	392	590311–591489 C	Glycosyltransferase	Glycosyltransferase family 1 protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe1D</i>	440	588992–590314 C	Glycosyltransferase	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<b><i>lpe2</i> cluster</b>					
<i>lpe2A</i>	507	580323–581846	Flippase Wzx	Transporter	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe2B</i>	255	578507–579274 C	Chain-length determinant Wzz	Polysaccharide biosynthesis protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe2C</i>	242	577767–578495 C	Tyrosine-protein kinase Wze	Exopolysaccharide biosynthesis protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe2D</i>	278	577007–577843 C	Protein-tyrosine phosphatase Wzb	Protein-tyrosine-phosphatase	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe2E</i>	218	576301–576957 C	Priming glycosyltransferase	Sugar transferase	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe2F</i>	289	575219–576088 C	Glycosyltransferase	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe2G</i>	418	573947–575203 C	Polymerase Wzy	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe2H</i>	269	573134–573943 C	Glycosyltransferase	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe2I</i>	237	572424–573137 C	Glycosyltransferase	Glycosyltransferase family 2	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe2J</i>	473	569872–571293 C	Flippase Wzx	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<b><i>lpe3</i> cluster</b>					
<i>lpe3A</i>	302	565206–566114 C	Glycosyltransferase	Glycosyl transferase family 2	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe3B</i>	310	564240–565172 C	Glycosyltransferase	Glycosyl transferase family 2	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe3C</i>	377	562594–563727 C	UDP-galactopyranose mutase	UDP-galactopyranose mutase	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe3D</i>	362	561445–562533 C	Tyrosine-protein kinase transmembrane module Wzd	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe3E</i>	207	560816–561439 C	Tyrosine-protein kinase Wze	Hypothetical protein HMPREF0531_11724	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe3F</i>	406	559609–560829 C	Polymerase Wzy	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe3G</i>	369	558503–559612 C	Unknown	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe3H</i>	359	557440–558519 C	<i>O</i> -acetyltransferase	Acetyltransferase	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe3I</i>	258	556528–557304 C	Glycosyltransferase	Exopolysaccharide biosynthesis protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe3J</i>	472	554920–556338	Flippase Wzx	Flippase	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe3K</i>	225	553806–554483	Priming glycosyltransferase	Sugar transferase	<i>Lb. plantarum</i>
<b><i>lpe4</i> cluster</b>					
<i>lpe4A</i>	252	2975111–2975869	Tyrosine-protein kinase transmembrane module Wzd	Polysaccharide biosynthesis protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe4B</i>	235	2975887–2976594	Tyrosine-protein kinase Wze	Exopolysaccharide biosynthesis protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe4C</i>	273	2976533–2977354	Protein-tyrosine phosphatase Wzb	Protein-tyrosine phosphatase	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe4D</i>	313	2977370–2978311	UDP-gucose 4-epimerase	Epimerase	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe4E</i>	221	2978298–2978963	Priming glycosyltransferase	Capsular polysaccharide biosynthesis protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe4F</i>	363	2978963–2980054	Glycosyltransferase	Glycosyl transferase family 1	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe4G</i>	342	2980070–2981098	Glycosyltransferase	Glycosyl transferase family 1	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe4H</i>	424	2981095–2982369	Polymerase Wzy	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe4I</i>	322	2982354–2983322	Glycosyltransferase	Glycosyl transferase family 2	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe4J</i>	324	2983879–2984853	Flippase Wzx	Flippase	<i>Lb. plantarum</i>
<b><i>lpe5</i> cluster (on the plasmid pSN35N-3)</b>					
<i>lpe5A</i>	374	979–2103 C	Glycosyltransferase	Glycosyltransferase family 2 protein	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>lpe5B</i>	485	7363–8820 C	Flippase Wzx	Flippase	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe5C</i>	169	9977–10486 C	Glycosyltransferase	Glycosyl transferase	<i>Bacillus cereus</i>
<i>lpe5D</i>	263	10483–11274 C	Glycosyltransferase	Hypothetical protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe5E</i>	302	11312–12220 C	Polymerase Wzy	EpsG family protein	<i>Lb. vaginalis</i>
<i>lpe5F</i>	338	12446–13462 C	Glycosyltransferase	Glycosyltransferase family 2 protein	<i>Clostridium clariflavum</i>
<i>lpe5G</i>	256	13452–14222 C	CDP-alkohol phosphatidyltransferase	Hypothetical protein	<i>Lb. sakei</i>
<i>lpe5H</i>	149	14209–14658 C	Glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase	Glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase	<i>Leuconostoc carnosum</i>
<i>lpe5I</i>	382	14661–15809 C	Glycosyltransferase	Hypothetical protein	<i>Leuconostoc mesenteroid</i>
<i>lpe5J</i>	231	15836–16531 C	Priming glycosyltransferase	Sugar transferase	<i>Lactobacillus coryniform</i>
<i>lpe5K</i>	312	16578–17516 C	UDP-gucose 4-epimerase	UDP-gucose 4-epimerase	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe5L</i>	96	17541–17831 C	Protein-tyrosine phosphatase Wzb (truncated)	Tyrosine protein phosphatase	<i>Lactobacillus</i> sp.
<i>lpe5M</i>	262	19596–20384 C	Protein-tyrosine phosphatase Wzb	Polysaccharide biosynthesis protein, phosphotyrosine-protein phosphatase	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe5N</i>	242	20356–21084 C	Tyrosine-protein kinase Wze	Exopolysaccharide biosynthesis protein	<i>Lb. plantarum</i>
<i>lpe5O</i>	255	21096–21863 C	Tyrosine-protein kinase transmembrane module Wzd	Chain length regulator	<i>Lb. paraplantarum</i>
<i>lpe5P</i>	154	22111–22575 C	Glycosyltransferase (truncated)	Hypothetical protein	<i>Lb. collinoides</i>

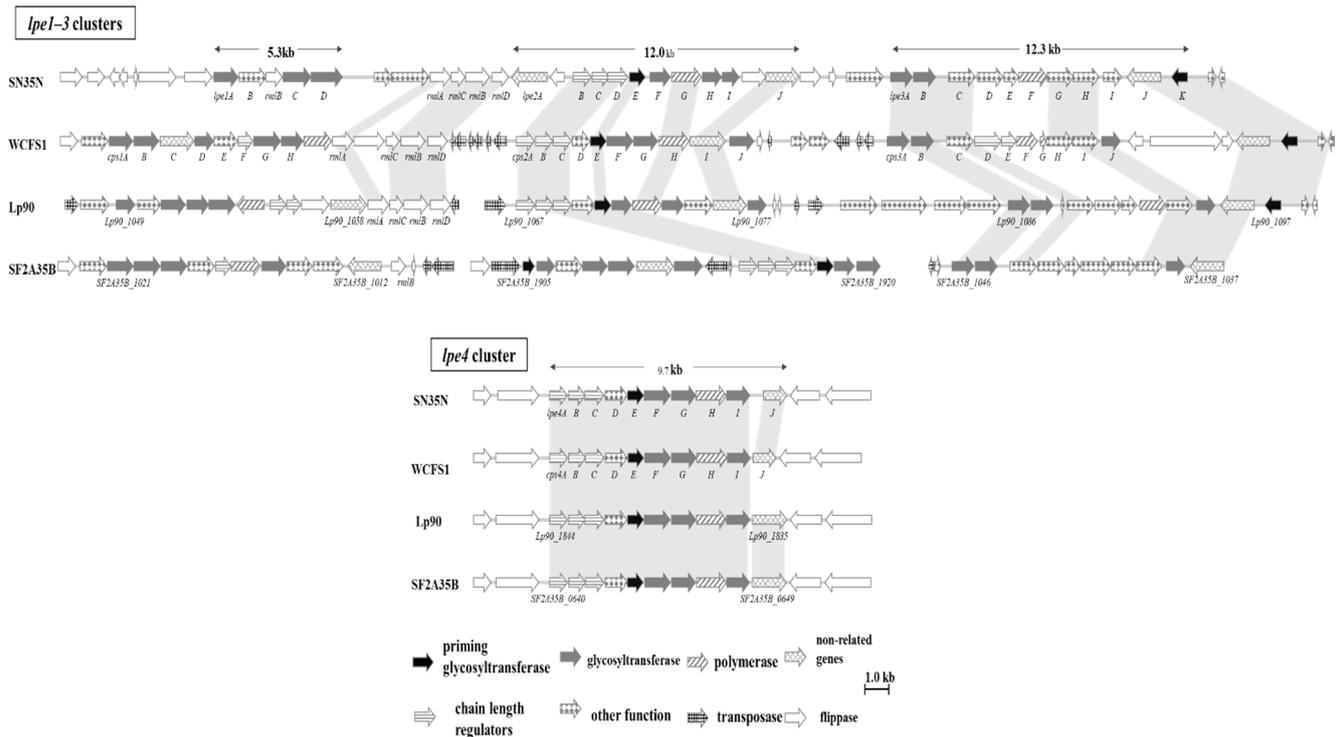


Fig. 11 *Lb. plantarum* SN35N の *lpe1-4* クラスターと他株の比較

4つのクラスター中でサイズの最も小さい *lpe1* クラスターは、EPS 生合成に関与していると予測される *lpe1A*, *lpe1B*, *lpe1C*, *lpe1D* の4つの open reading frame (ORF) を含んでいる。*lpe2* と *lpe3* クラスター (*lpe1* に隣接) は、10 (*lpe2A-J*) および11の (*lpe3A-K*) ORF から成る。*lpe4* クラスターは、*lpe1* から 880 kb 離れた位置に存在する。これらのクラスター間で、*lpe2* と *lpe4* は、EPS 生合成のために必要と思われる以下の遺伝子を含んでいる。すなわち、priming glycosyltransferase (*lpe2E* と *lpe4E*) , glycosyltransferase (*lpe2F*, *lpe2H*, *lpe2I*, *lpe4F*, *lpe4G*, *lpe4I*) , flippase (*lpe2A*, *lpe2J*, *lpe4J*) , polymerase (*lpe2G*, *lpe4H*) と chain length factor (*lpe2B*, *lpe2C*, *lpe2D*, *lpe4A*, *lpe4B*, *lpe4C*) が存在していた。

また、本株には4つのプラスミド、pSN35N-1, -2, -3, -4 が存在することも明らかとなった。SN35N 株の染色体 DNA 上には、4つの EPS 生合成のクラスター (*lpe1*, *lpe2*, *lpe3*, *lpe4*) 以外に、もう1つの EPS 生合成クラスター (*lpe5*) が存在し、それは pSN35N-3 プラスミド上にあった。その遺伝子クラスターのサイズは 22 kb、プラスミドの塩基対数は 35,425 bp であった。また、このクラスターは 16 個の ORF (*lpe5A-P*) を持ち、その遺伝子クラスターの近傍に transposase をコードする 11 の遺伝子の存在が認められた (Table 9, Fig. 12A)。

## 第2節 多糖体生合成遺伝子クラスターの比較

構成糖の種類とともに、EPS 生合成遺伝子クラスターが明らかにされている *Lb. plantarum* として、WCFS1 株、SF2A35B 株、そして Lp90 株がある[62,63]。WCFS1 株の産生する EPS はグルコース、ガラクトース、グルコサミン、ラムノースが 28: 17: 3: 5 の比率で構成されている。また、SF2A35B 株においては、おもにガラクトースとガラクトサミンで構成され、グルコース含量は少ない(それぞれ 66.6: 31. 3: 2)、Lp90 株はグルコサミン、ガラクトース、ガラクトサミン、ラムノースが同程度で、グルコースは少ない (それぞれ 24.5: 22.2: 24.4: 25.0: 3.9) EPS をそれぞれ産生する。以上のことから考えると、*Lb. plantarum* の産生する EPS の構成糖は非常に多岐にわたっている。なお、SN35N 株は、マンノースを主成分とする EPS を産生しており、菌株特異的な EPS であることが明らかである。

EPS の構成糖と生合成遺伝子クラスターが共に明らかにされている WCFS1 株、SF2A35B 株、および Lp90 株の 3 株を対象として比較した (Fig. 11)。

WCFS1 株では、*cps1-4* の個々のクラスターが EPS 生合成に関与していることが、各クラスターの遺伝子破壊実験により、明らかにされている[64]。一方、SF2A35B 株および Lp90 株の 2 株に関しては、*cps2* 類似のクラスターを破壊した場合に、EPS の産生能が 95%以上低下することが報告されている[65]。このことは、EPS 生合成遺伝子クラスターを複数保有している場合でも、実際に機能しているクラスターは株ごとに異なっており、株ごとの構成糖の違いにも関係している。

乳酸菌 *Lb. bulgaricus* はプラスミドを保有しないが、*Lc. lactis* のほとんどの株ではプラスミドを保有している[1]。乳酸菌において、EPS 生合成遺伝子がプラスミド上にコードされている報告として、*Lb. buchneri* CD034 の pCD034-3 [66]、*Lc. lactis* NIZO B40 の pNZ4000 などがある[67]。NCBI に全ゲノム情報が公開されている *Lb. plantarum* の 42 菌株について調査したところ、6 つの株 (16 株、C410 L1 株、HFC8 株、LZ227 株、TMW1.1623 株、および ZJ316 株) において、プラスミド上に EPS 生合成に関係すると推定される遺伝子クラスターに存在することが確認された (Fig. 12B)。

SN35N 株の保有するプラスミド pSN35N-3 上に存在が確認された *lpe5* クラスターが、本株における EPS 生合成にどの程度寄与しているかを調査するため、プラスミドの脱落試験を試みた。SN35N 株を親株として、DNA ジャイレースの阻害剤であり、プラスミド脱落実験用の試薬として汎用されるノボビオシン処理により、寒天平板上で粘性に乏しい、すなわち EPS 産生性の低下した変異株

を取得することができた。PCRにより確認したところ、この変異株は pSN35N-3 上に存在する *lpe5* 遺伝子クラスターを失っていたことがわかった。さらに、SN35N- $\Delta$ p3 と命名した本変異株の EPS 産生量を比較したところ、202 mg/L から 3.3 mg/L にまで低下していた。すなわち、SN35N 株の保有する pSN35N-3 プラスミド上に存在する *lpe5* クラスターは、本株が産生する EPS の生合成に大きく関与している生合成遺伝子クラスターであると結論づけることができた。

SN35N 株の保有する *lpe5* クラスター中には、いくつかの *transposase* 遺伝子も見出されており、このことから、この EPS 生合成遺伝子クラスターは変異や挿入を繰り返す過程でプラスミド上にコードされ、伝播した可能性がある。

Table 9 に示すように、各クラスター上の遺伝子の相同性検索結果をみても、この遺伝子の起源として挙がってくる菌種は *lpe1-4* ではほぼすべてが *Lb. plantarum* である。一方、*lpe5* クラスターは *Leuconostoc* 属や *Bacillus* 属の細菌にも存在することから、本クラスターの特異性を示すものである[68]。

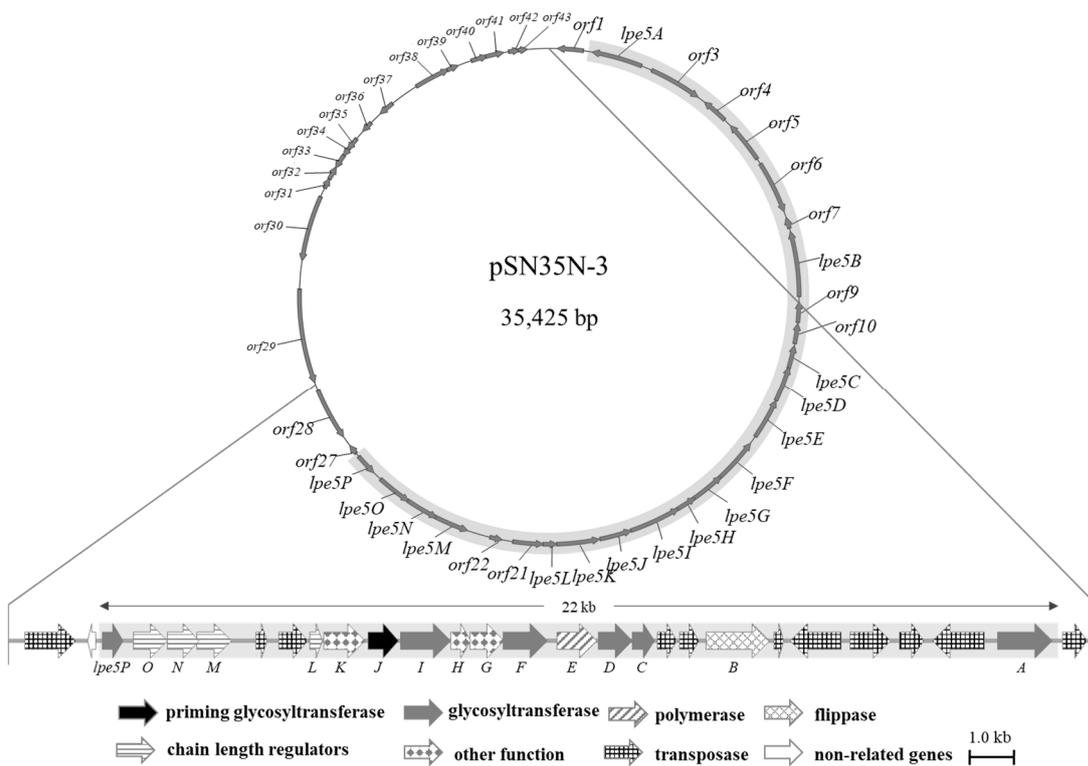


Fig. 12A. pSN35N-3 の環状 DNA と遺伝子クラスター

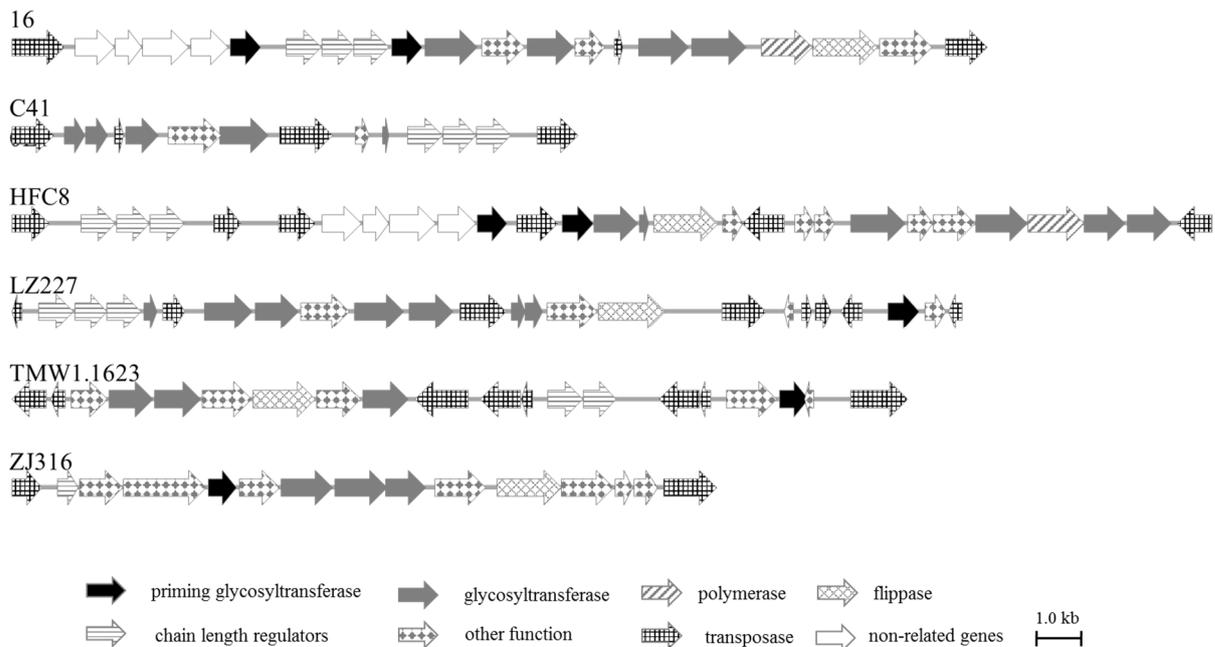


Fig. 12B. 他の *Lb. plantarum* で plasmid 上に存在することが確認されている EPS 生合成遺伝子クラスター

## 【第IV章】総括

*Lb. plantarum* SN35N が産生する酸性 EPS の分子量は約  $2.5 \times 10^6$  であった。他の乳酸菌の EPS の分子量は、40,000~60,000 のものが多く、それに比べると分子量はかなり大きい。ただし、例外として、分子量が  $1.0 \times 10^6$  程度の EPS を産生する乳酸菌も知られている。乳酸菌にとっての EPS は、乾燥、毒性化合物、バクテリオファージなどから、自らの細胞を守るためにつくられると考えられるが、*Lactobacillus* 属のつくる EPS はバイオフィルムを形成できない。

SN35N 株の酸性 EPS を構成する単糖は、グルコース：ガラクトース：マンノース=14.3：5.7：1 (mol比) であった。

例えば、*Lb. plantarum* 70810 の EPS の単糖はガラクトースだけであり [69]、*Lb. plantarum* YW11 の EPS はグルコース：ガラクトース=2.7：1、*Lb. plantarum* C88 の EPS はグルコース：ガラクトース=2：1 であり、*Lb. plantarum* KF5 の EPS はグルコース：ガラクトース：マンノース=5：6.9：1、*Lb. plantarum* BC-25 の EPS はグルコース：ガラクトース：マンノース=6：1.8：92 [70-73]であることを考えると、*Lb. plantarum* の中では、構成単糖が3種類あり、グルコースの割合が大きいのが特徴であろう。上記の単糖以外をもつ *Lb. plantarum* Lp90 の EPS は、グルコース：ガラクトース：ガラクトサミン：ラムノース=24.5：22.2：24.4：25.0：3.9 [70]であるが、グルコースの割合が小さい。他方、*Lb. bulgaricus* OLL 1073R-1 の産生する EPS は、リン酸基で修飾された酸性 EPS であるが、グルコース、ガラクトースのみから成る [48]。他の乳酸菌の EPS の構成糖として、グルコース、ガラクトース、マンノース以外に、*N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチルガラクトサミン、ラムノース、フルクトースなどが存在することがわかっている [74, 75]。

SN35N 株の酸性 EPS は、リン酸基を持つことに起因している。解離されたリン酸が判別でき、またその量から、EPS 中にリン酸基は多数存在すると考えられる。リン酸基を持つ EPS を産生する乳酸菌として、ほかに *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073 R-1 や *Lc. lactis* subsp. *cremoris* FC が知られている [8, 48]。また、*P. pentosaceus* LP28 はピルビン酸基を持つ酸性 EPS を産生することが当研究室の研究で見出された [50]。

乳酸菌で EPS を産生する株には、中性 EPS のみ産生する株や酸性 EPS のみを産生するものがあるが、*Lb. plantarum* LP14 は、1種類の中性 EPS と2種類の酸性 EPS をもち、酸性 EPS にはカルボキシル基と硫酸基をもつ [44]。

データベース上に公開されている *Lb. plantarum* 各株のゲノムサイズを比較してみると、約 2.9 Mb から最大で約 3.4 Mb と、かなりの長さの違いが認められる。実際、コードされている遺伝子の推定数も約 2,700~3,200 と、株間における違いが目立つ[19, 61]。 *Lb. plantarum* はさまざまな植物から分離されているが、そのゲノムサイズの違いは、それぞれの生育環境に適応した結果であると考えられる。本研究材料としての *Lb. plantarum* SN35N は、既存の乳酸菌株と比較したとき、ゲノムサイズと遺伝子数が大きく、特有の遺伝子を保有する可能性がある。

本研究において、SN35N 株のゲノムサイズは 3,267,626 bp で、環状構造を持つことが証明された。SN35N 株ゲノムの GC 含量は 44.51% で、予測遺伝子の数は 3,146 である。また、本菌株は 4 つのプラスミド、pSN35N-1, -2, -3, および-4 を保有している。SN35N 株の染色体 DNA 上には 4 つの EPS 生合成のクラスター *lpe1-4* が存在するが、もう一つの EPS 生合成クラスター (*lpe5*) は、35,425 bp より成る pSN35N-3 プラスミドにあることがわかった。また、ノボビオシン処理により、*Lb. plantarum* SN35N のプラスミド脱落株を取得した結果、EPS をほとんど生成しない変異株 SN35N- $\Delta$ p3 を得ることができた。本変異株の EPS 産生量を調査した結果、pSN35N-3 プラスミド上の *lpe5* が EPS 生合成に関与していることが示唆された。

本研究において、SN35N 株の産生する酸性 EPS は、ヒアルロニダーゼに対する阻害活性が認められた。第 2 章の緒言に述べたように、ヒアルロニダーゼの触媒活性の抑制は、IgE が媒介するマスト細胞からのヒスタミン放出の抑制と正の相関があることがわかっている[58,59,76,77]。本酸性 EPS のヒアルロニダーゼ阻害活性は、以前に当研究室において、タイ国 (Tailand) 産のトロピカルフルーツから分離された好熱性乳酸菌 *Lb. amylovorus* PY45 および *P. pentosaceus* LY45 の産生する EPS や、褐藻類が分泌する多糖類フコイダンよりも強い[44]。また、IC<sub>50</sub> 値は既存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よりは弱い、グリチルリチン酸ジカリウムより強い値であった。すなわち、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ある。また、当研究室において、既に報告している植物乳酸菌由来の中性 EPS は、酸性 EPS に比べて、ヒアルロニダーゼ活性を強く阻害する[44]。しかしながら、その中性 EPS よりも SN35N 株由来の酸性 EPS の方が、阻害活性が高く、非常に興味深い。酸性 EPS は中性 EPS と共存すると、ヒアルロニダーゼ阻害度が相乗的に上昇する。この相乗作用は、酸性の特性よりも、むしろその構成糖や立体構造に起因するのかもしれない。また、中性 EPS をリン酸化すると、免疫賦活能が上昇するとの報告

がなされている[48, 78, 79]。

以前、当研究室では、マウスを用いた動物実験により、SN35N 株の菌体の安全性試験を実施した。具体的には、経口投与による急性毒性試験および変異原性試験の結果、両者とも陰性を示しており、安全性が担保されている。したがって、SN35N 株はプロバイオティクスとして十分期待できる乳酸菌株である。

## 【謝 辞】

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導およびご助言を賜りました杉山政則教授に心より感謝申し上げます。また、実験手技をご指導下さり、かつ、ご助言を賜りました、熊谷孝則准教授、野田正文特任准教授、ならびに Narandalai Danshiitsoodol 特任助教に深甚なる感謝の意を表します。また、実験にご協力いただきました、広島大学生命科学分析センターならびに興人ライフサイエンス株式会社の梶直人氏に厚くお礼を申し上げます。

### ○ 原著論文

Characterization of the SN35N strain-specific exopolysaccharide encoded in the whole circular genome of a plant-derived *Lactobacillus plantarum* :

Masafumi NODA, Masaya SHIRAGA, Takanori KUMAGAI, Narandalai DANSHIITSOODOL, and Masanori SUGIYAMA

Biological & Pharmaceutical Bulletin, (The Pharmaceutical Society of Japan), 2018.

## 【実験の部】

### 1. 培養液の作製と *Lb. plantarum* SN35N の培養

以下の組成の modified SDM を用いた。

modified SDM 培地の組成 [g/L]

Glucose	20
Tween	1.0
Ammonium citrate	2.0
Sodium acetate	5.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.05
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0
Bacto casitone	10.0

### 2. SN35N 株の EPS の抽出 [45]

細胞外多糖体を得るために、Vitamine Soln<sup>†</sup> 2 mL/L と Trace element Soln<sup>†</sup> 1 mL/L および SN35N 株の前培養液 1 mL/L を 1 L の密閉容器に入れたものを合計 5 ボトル (5 L) 用意し、インキュベータに入れ 28 °C に保ち、3 日間静置培養した。その培養液は 118 °C にて 15 分間滅菌した。

† Vitamine Soln	[g/L]
4-aminobenzoic acid	0.05
Biotin	0.001
Folic acid	0.025
Lipoic acid	0.025
Nicotinic acid	0.1
Pantothenic acid	0.05
Pyridoxamin-HCl	0.25
Vitamin B <sub>12</sub>	0.05
Pyridoxine	0.025
Riboflavin	0.05
Thiamine	0.1

‡ Trace element Soln

25%HCl	10 [mL/L]
FeCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.5 [g/L]
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.19 [g/L]
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.1 [g/L]
ZnCl <sub>2</sub>	0.07 [g/L]
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.006 [g/L]
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.036 [g/L]
NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.024 [g/L]
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.002 [g/L]

### 3. 培養液からの EPS の抽出

培養液から EPS を取り出すために、まずタンパク質を変性させた。トリクロロ酢酸 (Trichloroacetic acid : TCA) を 40 mL/L となるように加え、30 分間攪拌した後、遠心用ボトルに移して、13,000×g、30 分間、4 °C で遠心を行った。

遠心後、多糖などが沈殿したものの上清 1 L に対し、等量のアセトンを添加した後に 1 日間静置し、その後 13,000×g で 15 分間 4 °C で遠心して、上清を捨て、沈殿を 70% エタノールで洗浄後、15 分間風乾した。EPS を含む固形物を取り出し、4 °C で保管した。

50 mM の Tris-HCl を加え、保存した固形物を溶解し、DNase I および RNase を各 1 mg/mL となるよう加え、37 °C で 8 時間反応させた。Proteinase K を 2 mg/mL となるよう加え、37 °C で 16 時間以上静置した。

反応液と TCA を 10 : 1 で混合した後、4 °C で 1 時間冷却し、13,000×g で 30 分間遠心した。得られた上清に 100% エタノールを加え、10 分間振盪したあと、15 分間遠心した。70% (v/v) エタノールを 100 mL ずつ入れ軽く攪拌した後、15 分間遠心して上清を捨て、風乾した。

2 本それぞれに 30 mL の蒸留水を入れて、一晚置いた。限外濾過ユニット (Merck Millipore, 10K MWCO) に入れ、3000×g、4 °C で、30 分間遠心した。蒸留水を加え、buffer が蒸留水に置き換わるまで遠心・濃縮を繰り返した (約 600,000 倍以上になるまで薄めた)。

#### 4. 中性 EPS と酸性 EPS の分離と分子量による分画

得られた EPS を陰イオン交換カラム (TOYOPEARL DEAE-650M) にアプライし, EPS を溶出した。

陰イオンオープンカラム交換クロマトグラフィーを行った。

- A. TOYOPEARL DEAE-650M を充填したオープンカラムに EPS をアプライし, 50 mM Tris-HCl buffer (pH8.0) を移動相として分画を行った。6 分ごとに溶出液 (6 mL) を回収し, 全部で 40 fraction を分取した。
- B. 続けて, 酸性基をもつ EPS を抽出するために, 同 buffer を移動相とし, 0-0.5M の NaCl 濃度勾配により, さらに分画を行った。A と同様, 6 分ごとに溶出液を回収し, 全部で 60 fraction を分取した。

フェノール硫酸法[47]により糖の存在を確かめ, 該当する fraction のみを A, B よりそれぞれ選び出した。まず, A より該当する fraction を一緒にして, 限外濾過ユニットに入れて, 遠心した (C とする)。同様に, B の該当する fraction を一緒にして, 限外濾過ユニットに入れて遠心した (D とする)。

C, D それぞれが 1 本の限外濾過ユニットに収まる液量までに濃縮されたあとに, C,D 中に含まれる buffer 類が少なくとも 10 万倍以上に希釈されるまで, 蒸留水を加えながら, 遠心・濃縮を繰り返した。最終的に, C, D それぞれに蒸留水を入れ 5 mL にして, それぞれを凍結乾燥した。

#### 5. EPS の分子量の測定

酸性 EPS の分子量は, 糖分析用カラム KS806 を使用した HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーによって分析した。分子量の標準物質としてプルランを用いて作成した検量線から EPS サンプルの分子量を算出した。

蒸留水 0.7 mL/分の流量で, 温度は 80 °C でセットし, 溶出液は RI 検出器でモニターした。分子量をスタンダードを用いた較正カーブから計算した。

#### 6. 酸性 EPS の構成単糖の分析

酸性 EPS を構成する単糖類の組成は, 酸加水分解法によって分析した。まず, 凍結乾燥した EPS を, 10 mL の蒸留水に溶かした。18 M の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 300 μL 加えた後に, Ba(OH)<sub>2</sub>•8H<sub>2</sub>O を加えて中和した。110 °C で 3.5 時間, 加水分解して, 0.45 μm 孔の膜濾過器で濾過した。酸性 EPS とスタンダードを HPLC SUGAR

SP0810 カラム (昭和電工) を用い、蒸留水を 0.7 mL/min の速度で流した。カラム・オープン温度は 80 °C とし、溶出液を RI 検出器でモニターした。

#### 7. 酸加水分解法による酸性基の検出

まず、1.0 mg の酸性 EPS を 5 mL の蒸留水に溶かし、終濃度 0.02% (w/v) となるように調製した。EPS 溶液 5 mL と 40 g/L の  $K_2S_2O_8$  1 mL を混ぜ合わせた後に、混合物を 30 分間 120 °C で加熱した後、室温で冷却した。加熱しないサンプルと蒸留水を control として使った。

次に、蒸留水で 4 倍、10 倍、20 倍に希釈したサンプル 100  $\mu$ L と 1 mL の BIOMOL グリーン試薬 (バイオモル社) を混ぜ、25 分間、室温で反応させた。EPS 中のリン酸の存在と量は、80~5  $\mu$ M の連続 2 倍希釈により調製したリン酸溶液の 620 nm の吸光度測定により作成した検量線を基に求めた。

#### 8. ヒアルロニダーゼに対する阻害活性の測定

ヒアルロニダーゼ活性の評価は、Fujitani らの方法[60]により行った。EPS 試料は蒸留水 10  $\mu$ L に段階希釈して調整した。それに、100 mM の  $NaCH_3COOH$  buffer (pH 4.0) に調製した 4 mg/mL のヒアルロニダーゼ溶液 (MP Biomedicals, Santa Ana) 5  $\mu$ L を加え、20 分間 37 °C で温め、混合液とした。

混合液を 37 °C で 20 分間インキュベーションした後に、0.5 mg/mL の Compound 48/80 溶液 (MP Biomedicals) を含んだ酵素活性液 10  $\mu$ L と同じ buffer 中に 3.75 mg/mL の  $CaCl_2 \cdot H_2O$  を入れたものに加え、さらに 37 °C で 40 分間インキュベートした。

0.8 mg/mL のヒアルロン酸溶液 (和光) 25  $\mu$ L を加えたあと、反応混合物が 40 分間 37 °C で保たれた。反応を止めるために、400 mM の NaOH 10  $\mu$ L を混合液に加えた。サンプルには、さらに 100 mM のホウ酸カリウム buffer (pH 10.0) 10  $\mu$ L が混合された。3 分間 100 °C で保った後、サンプルをすぐに氷冷した。

*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 (*p*-DMAB, 和光) に、5 g の *p*-DMAB, 6 mL の 10 M の HCl, 44 mL の酢酸を混合した溶液を酢酸で徐々に薄めたものを 10 本ずつ準備した。そして、溶液 : サンプル = 4:1 の比率で混ぜ合わせた。各々のサンプルの 585 nm の吸収度は、Versa Max マイクロプレート (Molecular

Devices, USA) を利用して測定した。ヒアルロニダーゼを含まないサンプルを、control として使った。

## 9. DNA の抽出と精製

SN35N の染色体 DNA は、まず菌体を遠心分離によって培養液から収集し、グルコース EDTA buffer (50 mM のグルコース, 10 mM の EDTA, 25 mM の トリス-HCl, pH 8.0) で洗浄した。洗浄した菌体は、同じ buffer で再懸濁した。次に、10 µg/mL の RNase (ナカライテスク, 京都), 4 mg/mL の リゾチーム (和光純薬, 大阪) と 0.4 mg/mL の achromopeptidase (和光純薬) を混ぜて、37 °C で 3 時間 インキュベーションした後、細胞に 10% の SDS を加えることによって溶解した。そして、タンパク質はクロロホルム/イソアミル・アルコール抽出によって除去した。最後に、染色体 DNA は、エタノール沈殿によって精製した。

## 10. 染色体 DNA とプラスミド DNA の解析

SN35N 株の染色体 DNA の塩基配列の解析は、PacBio RS II を用いて行った。得られた完全長の塩基配列に対し、微生物ゲノムパイプライン (MiGAP) を使い、アノテーションを行った。また、解析には、in silico Molecular Cloning Genomics Edition (In Silico Biology, Inc.) プログラムを用いた。

## 11. EPS を生成しない SN35N 株変異体の作出

EPS を生成しない *Lb. plantarum* SN35N からの変異体は、次のようにして作出した。プラスミド脱落用試薬としてノボビオシンを使用した。MRS 培地に 0.8 µg/mL のノボビオシンを添加して、SN35N 株を一晩培養した。2 日間の培養後、一部の培養菌を新しい MRS 寒天培地に植えつけ、プレートにコロニーができるまで、約 2 日間嫌氣的に培養した。EPS を産生する親株のプラスミドとそれぞれのコロニーの中の EPS を産生しない変異株中の *lpe5* クラスターの存在については、PCR で増幅したあと、2 種類のプライマー (5'-catcgcaattatgatcaagcgcg-3' および 5'-gacgctgcttagcactactcacta-3') を用いて検出した。

## 【参考文献】

- [1] 杉山政則, 植物乳酸菌の挑戦, 広島大学出版会 (2012) .
- [2] 青木健次, 微生物学, 化学同人 (2007) .
- [3] 渡邊正行, *Lactobacillus* 属細菌の環境適応能の解析とその応用に関する研究, 国立国会図書館, 永続的識別子 info:ndljp/pid/9506192, (2015) .
- [4] Noda M, Miyauchi R, Danshiitsoodol N, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M, The expression of bacteriocin production and self-resistance in *Lactobacillus brevis* 174A is mediated by two regulatory proteins, *Appl. Environ. Microbiol. Biol.*, in press (2018) .
- [5] 牧野聖也, 池上秀二, 狩野宏, 伊藤裕之, 免疫調節多糖体を産生する乳酸菌を活用した機能性ヨーグルトの開発, 化学と生物, **53(10)**, p.709–714 (2015) .
- [6] 関口守衛, 科学的エビデンスが乳酸菌生産物質の謎を解く, 健康実践研究所 (2012) .
- [7] 牧野聖也, 池上秀二, ヨーグルト乳酸菌が産生する菌体外多糖の利用と培養条件の影響, 日本乳酸学会誌, **24(1)**, p.10–17 (2013) .
- [8] 松崎千秋, 乳酸菌が産生する菌体外多糖の働きは?, 生物工程学, **93(3)**, p.154 (2015) .
- [9] 島田歩, 乳幼児口腔内における乳酸菌の分布と齲蝕関連因子の探索, 国立国会図書館書誌 ID 024919227, 請求記号 UT51-2013-G334, (2013) .
- [10] 杉山政則, 現代乳酸菌科学:未病・予防医学への挑戦, 共立出版 (2015) .
- [11] 日本乳酸菌学会, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会 (2010) .
- [12] 小川順, 岸野重信, 乳酸菌代謝と美味しい健康生活, 生物工程学, **91(11)**, p.637–640 (2013) .
- [13] Sanders ME, Probiotics: definition, sources, selection, and uses., *Clin. Infect. Dis.*, **46 Suppl 2**, S58–61 (2008) .
- [14] Cotter PD, Hill C, Ross RP, Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, p.777–788 (2005) .
- [15] Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM. Yogurt and gut function. *Am. J. Clin. Nutr.*, **80**, p.245–256, (2004) .
- [16] Meydani SN, Ha WK, Immunologic effects of yogurt. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, p.861–872, 2000.
- [17] 井上明, 微生物学, オーム社 (2006) .
- [18] 杉山政則, 現代微生物学, 共立出版 (2010) .
- [19] Heczko, P. B, Strus, M, Kochan, P, Critical evaluation of probiotic activity of lactic acid bacteria and their effects. *J. Physiol. Pharmacol.*, **57**, p.5–12 (2006) .
- [20] Fuller R, Probiotics in man and animals, *Journal of Applied Bacteriology*, **66**, p.365–378 (1989) .
- [21] Salminen S, Isolauri E, Salminen E, Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal

- barrier, *Antonie Van Leeuwenhoek*, Oct, **70(2-4)**, p.347–358 (1996) .
- [22] 森田英利, 乳酸菌のゲノム解析について,  
<http://www.nyusankin.or.jp/scientific/morital.html>, (accessed 2017-8-16) .
- [23] Heczko P. B, Strus M, Kochan P, Critical evaluation of probiotic activity of lactic acid bacteria and their effects, *J. Physiol. Pharmacol.*, **57**, p.5–12 (2006) .
- [24] Tamura T, Noda M, Ozaki M, Maruyama M, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M, Establishment of an efficient fermentation system of gamma-aminobutyric acid by a lactic acid bacterium, *Enterococcus avium* G-15, isolated from carrot leaves. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, p.1673–1679 (2010) .
- [25] Wada T, Noda M, Kashiwabara F, Jeon HJ, Shirakawa A, Yabu H, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M, Characterization of four plasmids harboured in a *Lactobacillus brevis* strain encoding a novel bacteriocin, brevicin 925A, and construction of a shuttle vector for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Microbiology*, **155**, p.1726–1737 (2009) .
- [26] Jeon HJ, Noda M, Maruyama M, Matoba, Y Kumagai T, Sugiyama M, Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, p.9827-9833 (2006) .
- [27] 乳酸菌が産生する菌体外多糖 EPS, <http://fanblogs.jp/lacto/archive/8/0>, 2015.(accessed 2017-8-15).  
 免疫細胞を活性化する EPS, [lact.seesaa.net/article/428036937.html](http://lact.seesaa.net/article/428036937.html) (accessed 2017-8-15).
- [28] Makino S, Ikegami S, Kano H, Sashihara T, Sugano H, Horiuchi H, Saito T, Oda M, Immunomodulatory Effects of Polysaccharides Produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1, *J. Dairy Sci.*, **89(8)**, p.2873–2881 (2006) .
- [29] Sandrine Petry, Sylviane Furlan, Marie-Jeanne Crepeau, Jutta Cerning, and Michel Desmazeaud, Factors Affecting Exocellular Polysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Grown in a Chemically Defined Medium, *Appl. Environ. Microbiol.* , **66 (8)**, p.3427–3431 (2000) .
- [30] Higashikawa F, Noda M, Awaya T, Nomura K, Oku H, Sugiyama M, Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: a double-blind, randomized trial. *Nutrition*, **26**, p.367–374 (2010) .
- [31] Mitsuoka T, Development of functional foods. *Biosci. Microbiota Food Health*, **33**, p.117–128 (2014) .
- [32] Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S, Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and

- enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.*, **69**, p.2011–2015 (2006) .
- [33] **Higashikawa F, Noda M, Awaya T, Danshiitsoodol N, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M**, Anti-obesity effect of *Pediococcus pentosaceus* LP28 on overweight subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **70**, p.582–587 (2016) .
- [34] **Jin H, Higashikawa F, Noda M, Zhao X, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M**, Establishment of an *in vitro* Peyer's patch cell culture system correlative to *in vivo* study using intestine and screening of lactic acid bacteria enhancing intestinal immunity. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, p.289–293 (2010) .
- [35] **Zhao X, Higashikawa F, Noda M, Kawamura Y, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M**, The obesity and fatty liver are reduced by plant-derived *Pediococcus pentosaceus* LP28 in high fat diet-induced obese mice., *PLoS One*, **7(2)**, e30696 (2012) .
- [36] **Nácher-Vázquez M, Ballesteros N, Canales Á, Rodríguez Saint-Jean S, Pérez-Prieto SI, Prieto A, Aznar R, López P**, Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydr. Polym.*, **124**, p.292–301 (2015) .
- [37] **Nagaoka M, Hashimoto S, Watanabe T, Yokokura T, Mori Y**, Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, p.1012–1017 (1994) .
- [38] **Rodríguez C, Medici M, Rodríguez AV, Mozzi F, Font de Valdez G**, Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains. *J. Dairy Sci.*, **92**, p.2423–2434 (2009) .
- [39] **Higashikawa F, Noda M, Awaya T, Nomura K, Oku H, Sugiyama M**, Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: A double-blind, randomized trial. *Nutrition*, **26**, p.367–374(2010).
- [40] **Seema Patel, Avishek Majumder, and Arun Goyal**, Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria, *Indian J. Microbiol.*, **52(1)**, p.3–12(2012).
- [41] **Tamura T, Noda M, Ozaki M, Maruyama M, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M**, Establishment of an efficient fermentation system of gamma-aminobutyric acid by a lactic acid bacterium, *Enterococcus avium* G-15, isolated from carrot leaves. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, p.1673–1679 (2010) .
- [42] **Hyung Joon Jeon, Noda M, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M**, Crystal Structure and Mutagenetic Analysis of a Bacteriocin Immunity Protein, Mun-im., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **378**: p.574–578 (2009) .
- [43] **E.P.W. Kets, E.A. Galinski and J.A.M. de Bont**, Carnitin: a novel compatible solute in *Lactobacillus plantarum*, *Arch. Microbiol.*, **162**, p.243–248 (1994) .

- [44] **Panthavee W, Noda M, Danshiitsoodol N, Kumagai T, Sugiyama M**, Characterization of exopolysaccharides produced by thermophilic lactic acid bacteria isolated from tropical fruits of Thailand. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, p.621–629 (2017) .
- [45] **Kimmel SA, Roberts RF**, Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *Int. J. Food Microbiol.*, **40**, p.87–92 (1998) .
- [46] **Kets EPW, Galinski EA, de Bont JAM**. Carnitine: a novel compatible solute in *Lactobacillus plantarum*. *Arch. Microbiol.*, **192**, p.243–248 (1994) .
- [47] **DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F**, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, p.350–356 (1956) .
- [48] **西村順子**, ヨーグルトスターター乳酸菌が生産する菌体外多糖とその機能性, 平成 20 年度東北地区国立大学等技術職員研修「技術発表会」発表要旨 (2008) .
- [49] **後藤弥生**, Effects of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC against influenza virus infection and cold symptom, *Food style* 21, **18(12)**, p.63–66 (2014) .
- [50] **安武哲也**, *Pediococcus pentosaceus* LP28 のゲノム遺伝子配列の特異性と細胞外多糖の特徴に関する研究, 広島大学大学院医歯薬学総合研究科博士論文 (2008) .  
**杉山政則**, ペディオコッカス・ペントサセウスの新規な遺伝子, 特許【公開番号】特開 2017-108739 (P2017-108739A) , 2017 年 6 月 22 日 .
- [51] **Kang Zhou, Yiting Zeng, Menglu Yang, Shuliang Liu**, Production, purification and structural study of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25, *Carbohydr. Polym.*, **144(25)**, p.205–214 (2016) .
- [52] **鳴海孝佑, 積田亨**, 自然界のリン酸化多糖質, *生化学*, **40(6)**, p.1–44, 1968.
- [53] **牧野聖也**, 菌体外多糖を産生する乳酸菌で発酵したヨーグルトの免疫賦活作用, *腸内細菌学雑誌*, **29**, p.163–167 (2015) .
- [54] **Harata G, He F, Takahashi K, Hosono A, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M, Kaminogawa S**, *Bifidobacterium* suppresses IgE-mediated degranulation of rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Microbiol. Immunol.*, **54**, p.54–57 (2010) .
- [55] **Bourguignon LY, Wong G, Earle CA, Xia W**. Interaction of low molecular weight hyaluronan with CD44 and toll-like receptors promotes the actin filament-associated protein 110-actin binding and MyD88-NFκB signaling leading to proinflammatory cytokine/chemokine production and breast tumor invasion. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **68**, p.671–693 (2011) .
- [56] **Jiang D, Liang J, Noble PW**, Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **23**, p.435–461 (2007) .

- [57] **Yang CH, Srivastava PN**, Purification and properties of hyaluronidase from bull sperm. *J. Biol. Chem.*, **250**, p.79–83 (1975) .
- [58] **Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T**, Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, p.642–646 (1985) .
- [59] **Nakamura T, Kuriyama M, Kosuge E, Ishihara K, Ito K**, Effects of saiboku-to (TJ-96) on the production of platelet-activating factor in human neutrophils. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **685**, p.572–579 (1993) .
- [60] **Fujitani N, Sakai S, Yamaguchi Y, Takenaka H**, Inhibitory effects of microalgae on the activation of hyaluronidase. *J. Appl. Phycol.*, **13**, p.489–492 (2001) .
- [61] *Lactobacillus plantarum* Genome, Genome Assembly and Annotation report [205]; Genome Tree report [205] ; Plasmid Annotation Report [171].  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1108>, (accessed 2017-8-16)
- [62] **Michiel Kleerebezem, Jos Boekhorst, Richard van Kranenburg, Douwe Molenaar, Oscar P. Kuipers, Rob Leer, Renato Tarchini, Sander A. Peters, Hans M. Sandbrink, Mark W. E. J. Fiers, Willem Stiekema, René M. Klein Lankhorst, Peter A. Bron, Sally M. Hoffer, Masja N. Nierop Groot, Robert Kerkhoven, Maaïke de Vries, Björn Ursing, Willem M. de Vos, Roland J. Siezen**, Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100 (4)** , p.1990–1995 (2003).
- [63] **Dilna SV, Surya H, Aswathy RG, Varsha KK, Sakthikumar DN, Pandey A, Nampoothiri KM**, Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF<sub>4</sub>. *LWT Food Sci. Technol.*, **64**, p.1179–1186 (2015) .
- [64] **Remus DM, van Kranenburg R, van Swam II, Taverne N, Bongers RS, Wels M, Wells JM, Bron PA, Kleerebezem M**, Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling. *Microb. Cell Fact.*, Nov 21;11:149. doi: 10.1186/1475-2859-11-149 (2012) .
- [65] **Lee IC, Caggianiello G, van Swam II, Taverne N, Meijerink M, Bron PA, Spano G, Kleerebezem M**, Strain-specific features of extracellular polysaccharides and their impact on host interactions of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, p.3959–3970 (2016) .
- [66] **Heinl S, Wibberg D, Eikmeyer F, Szczepanowski R, Blom J, Linke B, Goesmann A, Grabherr R, Schwab H, Pühler A, Schlüter A**, Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. *J Biotechnol.*, **161**, p.153–166 (2012) .

- [67] **van Kranenburg R, Marugg JD, van Swam II, Willem NJ, de Vos WM**, Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.*, **24**, p.387–397 (1997) .
- [68] **Goh KK, Haisman DR, Singh H**, Development of an improved procedure for isolation and purification of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2483. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, p.202–208 (2005) .
- [69] **Wang K, Li W, Rui X, Chen X, Jiang M, Dong M**, Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810. *Int. J. Biol. Macromol.*, **67**, p.71–78 (2014) .
- [70] **Lee IC, Caggianiello G, van Swam II, Taverne N, Meijerink M, Bron PA, Spano G, Kleerebezem M**, Strain-specific features of extracellular polysaccharides and their impact on host interactions of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ. Microbiol.* **82**, p.3959–3970 (2016) .
- [71] **Wang J, Zhao X, Tian Z, Yang Y, Yang Z**, Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir, *Carbohydr. Polym.* **125**, p.16–25 (2015) .
- [72] **Zhou K, Zeng Y, Yang M, Chen S, He L, Ao X, Zou L, Liu S**, Production, Purification and Structural Study of an Exopolysaccharide From *Lactobacillus Plantarum* BC-25, *Carbohydr. Polym.*, **144**, p.205–214 (2016) .
- [73] 橋口健司, 長田裕子, 室伏陽, 北澤春樹, *Lactobacillus plantarum* No.14 株が生産する菌体外多糖の化学的性状と免疫活性, 日本乳酸菌学会誌, **22(2)**, p.100–105 (2011) .
- [74] 古野座智弘ほか, 粘質性乳酸菌 KW102 株から産生される EPS 構成糖の解析, 応用糖質科学, **1(3)**, p.56 (2011) .
- [75] **Surayot U, Wang J, Seesuriyachan P, Kuntiya A, Tabarsa M, Lee Y, Kim JK, Park W, You S**, Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structural analysis, molecular weight effect on immunomodulation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **68**, p.233–240 (2014) .
- [76] 最首信和, 齋尾美春, 岩永千歳, 鳥取県産農産物の抗アレルギー活性の測定, 鳥取県衛生環境研究所報, **47**, p.16–22 (2007) .
- [77] 増田勝己, 石原良子, 今川ゆかり, 谷政八, 食用野草のヒアルロニダーゼ阻害活性と抗補体活性, 仁愛女子短期大学研究紀要, **37**, 47–51 (2005) .
- [78] 西村順子, 乳酸菌の生産するリン酸化多糖の生合成系の解明と免疫賦活化ヨーグルトの作出, 科学研究費報告書, 若手研究(B) 13760186 (2001-2002) .
- [79] 西村順子, 乳酸菌起源のリン酸化多糖の免疫賦活化能の解明とその利用, 科学研究費, 基盤研究(C) 17580233 (2005-2006) .