研究報告

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

橋口 健司^{1)*}、長田 裕子¹⁾、吉田 睦子¹⁾、室伏 陽²⁾、北澤 春樹²⁾

¹⁾ 株式会社桃屋 研究所、²⁾ 国立大学法人東北大学大学院農学研究科

Lactobacillus plantarum No.14 株 (LP14) が生産する菌体外多糖 (Extracellular polysaccharides : EPS) について化学的性状解析を行った。EPS を分離後、イオン交換クロマトグラフィーにより分画した結果、1 種類の中性 EPS (neutral EPS : NPS) と 2 種類の酸性 EPS (weak acidic EPS : W-APS、strongly acidic EPS : S-APS) が存在し、さらにゲル濾過クロマトグラフィーにより分画した結果、NPS も 2 種類 (high molecular weight neutral EPS : H-NPS、low molecular weight neutral EPS : L-NPS) 存在することが明らかとなった。官能基解析の結果、W-APS はカルボキシル基 0.76%、S-APS は硫酸基 7.94% を含んでいた。4 種類の EPS の糖組成を解析したところ、H-NPS はガラクトース (Gal) : グルコース (Glc) : ラムノース (Rha) = 0.62 : 1.00 : 0.27、L-NPS はマンノース (Man) : Glc = 0.92 : 1.00、W-APS は Gal : Man : Glc = 0.41 : 6.74 : 1.00、S-APS は Gal : Man : Glc = 0.20 : 0.08 : 1.00 であり、4 種類全ての EPS で糖組成が異なった。ヒトモデルとして期待されるブタ腸管リンパ球に対する幼若化活性を指標とした免疫賦活能を検討した結果、全ての EPS がパイエル板および腸間膜リンパ節において有意な活性を示した。以上の結果から、LP14 が生産する EPS には 2 種類ずつの NPS と APS が存在し、それぞれの糖組成や官能基が異なっているにもかかわらず、全ての EPS が免疫賦活能を有することから、新たな生理活性に関する情報が得られる可能性が期待された。

Key words : *Lactobacillus plantarum*, EPS, NPS, APS, mitogenic activity

序 文

発酵食品の製造に欠かせない乳酸菌は、伝統的な日本食である漬物などにも多く含まれ、古くから日常的に食されてきた有用微生物である。乳酸菌による発酵は、食品の保存性や食感および風味を向上させるだけでなく、乳酸菌や乳酸菌代謝産物により整腸作用¹⁾、抗アレルギー作用²⁾、血中コレステロール低下作用³⁾、体脂肪減少作用⁴⁾、感染防御作用⁵⁾、抗がん作用⁶⁾、血圧降下作用⁷⁾ あるいは免疫賦活作用⁸⁾ など様々な生理機能が発揮されることが明らかとなった。このことは、乳酸菌による発酵がヒトの健康

の維持・増進に貢献できることを示唆するものである。

我々はこれまでに LP14 について、生物学的研究を進めてきた結果、LP14 がヒトに対して抗アレルギー効果や体脂肪減少効果を有すること⁴⁾、LP14 が生産する EPS は LP14 を摂取した際、消化吸收の過程でさらされる胃酸や胆汁酸ストレスに対する防御機構として働き、LP14 が生菌として腸管へ到着するまでの補助的な役割を発揮する可能性があること⁹⁾ などを明らかとしてきた。さらに、EPS が LP14 の有する生理機能の活性成分の 1 つである可能性が示唆された¹⁰⁾ が、LP14 の EPS に関する詳細な化学的および生物学的解明は行っていない。

そこで、本研究では LP14 が生産する EPS について分画・精製後、化学的性状解析を行った。また、生物活性としてヒトモデルとして期待されるブタ腸管リンパ球に対する幼若化活性を指標とした免疫賦活能について検討した。

*To whom correspondence should be addressed.

Phone : +81-48-735-6311

Fax : +81-48-737-6082

E-mail : hashiguchi@momoya.co.jp

材料および方法

1. 使用菌株

らっきょう漬けから分離された LP14 を使用した。de Man, Rogosa and Sharpe (MRS, OXOID) の液体培地にポリミキシン B (1mg/L) を加え、1 時間攪拌し、エンドトキシンを不活性化した。この MRS 培地に LP14 を接種し 30℃、24 時間前培養後、前培養物を MRS に 1% 量接種し 30℃、24 時間本培養を行った。

2. 多糖の精製

本培養物を遠心分離 (15,000 × g, 4℃, 20 分) 後、上清を回収し LP14 菌体を除去した。菌体に付着している EPS も回収するため、LP14 菌体を 2 回 PBS で洗浄し遠心分離後、上清を回収した。回収後の LP14 菌体を EPS 除去菌体とした。回収した上清は中和後、凍結乾燥により 10 分の 1 量に濃縮し、上清と等量の冷却エタノールを加え 4℃ に静置し、多糖類、タンパク質や核酸などを沈殿させた。上清を除去し水に溶解させた後、再度同様にしてエタノール沈殿させ、上清を除去し沈殿を水に溶解させた。1mM MgCl₂ を含む 5mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 中で、Deoxyribonuclease、Ribonuclease (各 7 μg/mL) を加え、37℃ で 6 時間酵素処理後、Proteinase K (200 μg/mL) を加え、37℃ で一晩処理した。加熱 (100℃、10 分) により酵素失活後、再度エタノール沈殿を 2 回繰り返した。その後、水に溶解させ、不溶物を遠心分離により除去した。得られた上清を排除分子量 13,000 の透析膜を用いて 48 時間透析を行い、凍結乾燥させた。

3. 陰イオン交換クロマトグラフィー

サンプルを 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.6) に溶解させ、陰イオン交換樹脂 DEAE-Toyopearl 650M (東ソー) に供し、非吸着多糖を回収した後、0.2M NaCl / Tris-HCl および 0.5M NaCl / Tris-HCl の順にステップワイズ法で APS を溶出させ回収した。分画は、バッチ法、流速 1.2mL/分、室温で分画を行った。検出はフェノール硫酸法¹¹⁾ により行い、Glc をスタンダードとして糖量を算出した。

4. 陽イオン交換クロマトグラフィー

陰イオン交換クロマトグラフィーで非吸着であった画分を透析、凍結乾燥後、100mM 酢酸・酢酸 Na buffer (pH5.0) に溶解させ、陽イオン交換樹脂 CM-Toyopearl 650M (カルボキシルメチル基、東ソー) に供し、NPS を回収した後、0.5M NaCl / 酢酸・酢酸 Na buffer により塩基性 EPS を回収した。分画は、バッチ法、流速 1.2mL/min、室温で行った。検出はフェノール硫酸法¹¹⁾ により行った。

5. ゲル濾過クロマトグラフィー

カラムは Asahipak GF-710HQ (φ7.5 × 300mm、サイ

ズ排除限界分子量 10,000,000、Shodex) を用い、移動相 100mM NaCl、カラム温度 40℃、流速 0.6mL/min の条件で HPLC (High Performance Liquid Chromatography、島津製作所) により分画した。検出はフェノール硫酸法¹¹⁾ で行い、分子量のスタンダードはデキストラン (Sigma) を用いた。

6. 官能基解析

リン酸基はバナドモリブデン酸吸光光度法¹²⁾、カルボキシル基は酸塩基逆滴定法、硫酸基は Dodgson 法¹³⁾ により測定した。

7. 糖組成解析

糖の組成分析は、ABEE (4-アミノ安息香酸エチルエステル) 糖組成分析キット (J-オイルミルズ) を用い (Gal, Man, Glc, Rha, キシロース: Xyl, アラビノース、リボース、フコース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトコサミン、N-アセチルマンノサミン、グルクロン酸を分析)、加水分解 (100℃、3 時間) → N-アセチル化 → ABEE 標識化 → HPLC 分析の手順で行った。HPLC は、カラム: XTerra MS C18 (φ4.6mm × 150mm、Waters)、カラム温度 30℃、流速: 1mL/min、移動相 A: 0.2M ホウ酸カリウム緩衝液 (pH8.9) / アセトニトリル = 93 / 7 と B: 0.02% トリフルオロ酢酸 / アセトニトリル = 50 / 50 のグラジエントモードを用いて蛍光検出器により検出した。

フルクトースについては ABEE 糖組成分析キットで測定できないため、F-キット (JK インターナショナル) を用いて測定した。

8. ブタ腸管リンパ球幼若化活性

試験試料はリンパ球幼若化活性のポジティブコントロールであるエンドトキシンや β-グルカン濃度がそれぞれ 16EU (Endotoxin Unit) /mg (約 3ng/mg)、3ng/mg 以下であることをそれぞれエンドスペシー ES-50M セット、ファンギテック G テスト MK (共に生化学バイオビジネス) により確認し、加熱 (56℃、30 分) を行った後に使用した。試験試料は 0.20 μm の EB-DISK を用いて濾過滅菌し、各種濃度に調製した。ブタ腸管パイエル板および腸間膜リンパ節を摘出し、それぞれから免疫担当細胞を調製した。細胞を 2 × 10⁵ cells/90 μl となるように RPMI 1640 培地 (1% Streptomycin/ Penicillin、2% FCS を含む) に懸濁後、96well プレートにまき、各サンプルを添加後 37℃、5%CO₂ 条件下で 32 時間培養した。各 well にトリチウムチミジンを添加し、さらに 37℃、16 時間培養した。培養液をグラスファイバー入り濾紙で濾過した。濾紙をバイアルに 1 枚ずつ入れ、液体シンチレーションカクテルを分注し、液体シンチレーションカウンターにて放射活性 (CPM) を測定した。放射活性の結果から、以下の計算式でリンパ球幼若化活性の相対値 (Stimulation Index) を算出した。Stimulation Index = (サンプルの CPM の平

均値 - Medium control の CPM の平均値) / (cell control の CPM の平均値 - Medium control の CPM の平均値)

9. 統計解析

ブタ腸管リンパ球幼若化活性は平均値 $\pm$ 標準偏差を求めた。有意差検定は Dunnett 検定を用いて、control に対して $p < 0.05$ の場合に有意差があると判定した。

結 果

1. イオン交換クロマトグラフィーによる EPS の分画

LP14 の EPS を分離した結果、1L の培地から約 170mg の EPS が得られた。精製 EPS 中の APS を分離するため、陰イオン交換クロマトグラフィーに供した結果、非吸着の EPS と 2 種類の APS (弱酸性 APS : W-APS、強酸性 APS : S-APS) が得られた (Fig. 1)。ここで得られた非吸着 EPS は NPS と塩基性 EPS が混在している可能性があったため、非吸着の EPS について陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果、NPS のみ存在し、塩基性 EPS は含まれないことが確認された (データ未掲載)。

2. ゲル濾過クロマトグラフィーによる EPS の分画

EPS をゲル濾過クロマトグラフィーによって分子量による分画を行った。その結果、NPS は 2 種類 (低分子量 NPS : L-NPS、高分子量 NPS : H-NPS) 存在することがわかった (Fig. 2)。W-APS および S-APS に関してはどちらも 1 ピークのみであった。スタンダードの分子量検量線から各 EPS の分子量を計算すると、H-NPS : 約 500,000 以上、L-NPS : 約 70,000、W-APS : 約 170,000、S-APS : 約 150,000 であった。また、全 EPS 量におけるそれぞれの重量 (%) は H-EPS : 23.8%、L-NPS : 32.3%、W-APS : 38.8%、S-APS : 5.1% であった。

Fig. 1. Fractionation of extracellular polysaccharides (EPS) produced by *Lactobacillus plantarum* No.14 (LP14) on DEAE-tyopearl 650M. Fractions (10 mL) were collected and assayed for neutral sugars at 490nm by phenol-sulfuric acid method. The elution was done by adding 0.2 and 0.5 M NaCl in Tris-HCl buffer. Fractions 1-6, 17-20 and 27-30 were pooled and used as fractions neutral EPS (NPS), weak acidic EPS (W-APS) and strong acidic EPS (S-APS), respectively.

3. 酸性 EPS の官能基解析

APS の生理活性発現には、官能基が重要であると考えられるため、官能基解析を行った。その結果、W-APS は 0.76% のカルボキシル基を含み、S-APS は 7.94% の硫酸基を含んでいることがわかった (Table 1)。

4. 糖組成解析

糖組成解析の結果、4 種類の EPS に含まれている Glc を 1.00 とした時のモル比で表すと、H-NPS は Gal : Glc : Rha = 0.62 : 1.00 : 0.27 であり、L-NPS は Man : Glc = 0.92 : 1.00 であった (Table 2)。また、W-APS は Gal : Man : Glc = 0.41 : 6.74 : 1.00 であり、S-APS は Gal : Man : Glc = 0.20 : 0.08 : 1.00 であった。フルクトースは 4 種類の EPS に含まれていなかった。以上の結果から、4 種類の EPS はそれぞれが特徴的な糖組成であることが示された。

5. ブタ腸管パイエル板および腸間膜リンパ節のリンパ球幼若化活性

分画した各 EPS、分画していない EPS および EPS 除去 LP14 菌体について、免疫賦活能の指標としてブタ腸管パイエル板および腸間膜リンパ節から調製した免疫担当細胞に対するリンパ球幼若化活性を測定した。その結果、パイエル板において、各 EPS は 100 μ g/mL で有意に活性が高かった (Fig. 3A)。一方、LP14 菌体においては 1 μ g/mL 以上の濃度で有意な活性が認められた。腸間膜リンパ節においてはさらに顕著な活性が認められ、W-APS、S-APS では 1 μ g/mL 以上、分画していない EPS、LP14 菌体では 10 μ g/mL 以上、NPS では 100 μ g/mL で有意な活性が認められ (Fig. 3B)、LP14 菌体や NPS に比べ APS の方が活性が高いことが認められた。

Fig. 2. Gel filtration of NPS collected after fractionating on DEAE-tyopearl 650M on Asahipak GF-710HQ. Fractions (0.2 mL) were collected and assayed for neutral sugars at 490nm by phenol-sulfuric acid method. Fractions 10-14 and 27-30 were pooled and used as Fractions high and low molecular weight NPS, H-NPS and L-NPS, respectively.

Table 1. The substituted ratio of functional group of W-APS and S-APS from *Lactobacillus plantarum* No.14.

APS	The substituted ratio of functional group (%)		
	phosphate	carboxyl	sulfate
W-APS	—	0.76	—
S-APS	—	—	7.94

Table 2. Sugar composition of H-NPS, L-NPS, W-APS and S-APS from LP14.

EPS	Molar ratio of sugars				
	galactose	mannose	glucose	rhamnose	xylose
H-NPS	0.62	—	1.00	0.27	—
L-NPS	—	0.92	1.00	—	—
W-APS	0.41	6.74	1.00	—	—
S-APS	0.20	0.08	1.00	—	Tr

Tr : Trace

また、今回は培養に MRS 培地を用いたため、MRS 培地由来の多糖成分や他の成分が混入し、解析結果に影響を与える可能性があった。そこで、EPS と同様に MRS 培地由来多糖を分画・精製して LP14 の EPS と比較した結果、MRS 培地多糖量は少なく、各多糖の糖組成は各 EPS と異なり、リンパ球幼若化活性に MRS 培地由来多糖の影響はほとんど認められないことを確認した（データ未掲載）。

考 察

LP14 が生産する EPS を分離し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画した結果、1 種類の NPS と 2 種類の APS があることがわかり、ゲル濾過クロマトグラフィーにより NPS も 2 種類存在することが認められた。これら EPS の糖組成分析の結果、4 種類全て異なる糖組成であることが示された。また、2 種類の APS ではカルボキシル基、硫酸基と官能基組成も異なっていたことから、それぞれの EPS の化学的特徴付けをすることができた。これまでに、いくつかの乳酸菌が生産する生理活性を有する EPS の化学的性状に関して報告がある。例えば、LP14 と同じ *Lactobacillus plantarum* である C64MRb、E112、G62、H2 が生産する EPS⁽¹⁴⁾ は分子量が全て 100,000 以下（多くは 10,000 以下）であり、糖組成も Glc と Gal のみであることから LP14 が生産する EPS とは大きく異なる。一方で、LP14 の生産する H-NPS の糖組成は *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* の SBT0495⁽¹⁵⁾、KVS20⁽¹⁶⁾、GCL1176⁽¹⁷⁾ が共通して生産する EPS の糖組成である Gal : Glc : Rha = 2 : 2 : 1 と、比較的類似している。また、*Acetobacter polysaccharogenes* MT-11-2 が生産する AC-1⁽¹⁸⁾ の糖組成

Fig. 3. The effects of EPS, NPS, APSs, and LP14 which was removed EPS on mitogenic activity with (A)Peyer's patch cells and (B)mesenteric lymph node cells of swine in the presence of 1, 10 and 100 µg/mL, respectively. Stimulation index was defined, calculated by the following equation :[(count per min in treated cultures) – (background count per min)]/[(count per min in control cultures) – (background count per min)]. Data are expressed as means ± standard deviation of triplicate determinations. *p < 0.05, and **p < 0.01 versus cells in the absence of stimulants.

は、Glc : Gal : Man : グルクロン酸 = 7 : 2 : 1 : 1 であり、LP14 の EPS では S-APS と比較的類似しているが、官能基がグルクロン酸と硫酸基という点で異なる。今後、EPS の構造と生理活性の関係を明らかにするため、各 EPS について構造決定をする必要がある。

免疫賦活能の指標としてリンパ球幼若化試験を行った結果から、分画した全ての EPS がパイエル板および腸間膜リンパ節、どちらにおいても有意な活性を示すことが明らかとなった。腸間膜リンパ節においては、APS がより強

い活性を持つことが認められたが、パイエル板においては糖組成や官能基による活性の差が認められなかったことから、今後、パターン認識受容体や免疫パラメータによる詳細な解析が必要である。

乳酸菌が生産する EPS の免疫賦活作用に関する報告は限られているが、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 が生産するリン酸基を有する APS は、IFN- γ 産生を増加させ NK 活性を高めること¹⁹⁾、その活性発現にはリン酸基が重要であること²⁰⁾、*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS20 株が生産するリン酸基を有する APS は、マクロファージからの IFN- γ や IL-1 α を増加させること¹⁶⁾などの報告がある。また、*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* GCL1176 由来の菌体外リン酸化多糖は、抗原提示細胞表面に発現するパターン認識受容体 RP105/MD-1 によって認識されることが示されている¹⁷⁾。これらの結果の多くは APS のみが強い活性を持っており、今回の結果からも同様の傾向が得られたが、LP14 においては NPS や LP14 菌体にも活性が認められる点が大変興味深い。一方、

乳酸菌の EPS ではないが、硫酸基を有するフコイダンには、アポトーシスを誘導することにより抗がん作用を示すこと²¹⁾が報告されており、官能基が免疫調節作用におけるシグナル伝達に関与している報告があることから^{17, 20)}、硫酸基を有する S-APS にも未知なる生理活性の可能性が期待される。以上のことは、LP14 の EPS がこれまでの報告と同様または新たな作用を有する可能性を示唆し、また、化学組成の異なる多糖と免疫活性発現との相関に関する新たな知見につながる可能性を示すものである。

乳酸菌やビフィズス菌が生産する EPS については多くの場合、分子量の違いなどから 1 種類または 2 種類が示されており、3 種類以上のものは報告が少ないことから^{14, 22)}、4 種類の EPS を生産する LP14 は菌株特異性があることが示唆された。今後、化学構造解析が進み、*L. plantarum* のゲノム情報を基礎とした多糖関連遺伝子解析とともに、免疫活性の詳細解析をさらに進めることにより、構造と活性の相関関係に関する新たな知見が得られるものと期待される。

参 考 文 献

- 1) 森穀、北條研一、越智大輔、安田智、渡部玲子、大村和伸、伴野順二、竹友直生、飯野久和 : *Lactobacillus casei* OLL2212 株の凍結乾燥末摂取が便秘傾向女性の排便回数、便性状に及ぼす影響。乳酸菌学会誌, 20, 97-102 (2009)
- 2) 増田健幸、中田雅也、岡田早苗、保井久子 : *Pediococcus pentosaceus* Sn26 株のアレルギー性下痢抑制作用及びその作用機序解析。乳酸菌学会誌, 21, 42-48 (2010)
- 3) Hosono, A., Otani, H., Yasui, H., and Watanuki, M. : Impact of fermented milk on human health : Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk, *Anim. Sci. J.*, **73**, 241-256 (2002)
- 4) 長田裕子, 上村佑也, 坂智秀, 吉田睦子, 西塔正孝, 工藤英機, 國崎直道, 五明紀春 : *Lactobacillus plantarum* No.14 株の抗アレルギー効果。日本食品科学工学会誌, 55, 625-631 (2008)
- 5) Huang, J.S., Bousvaros A., Lee J.W., Diaz A, Davidson E.J. : Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children : a meta-analysis, *Dig. Dis. Sci.*, **47**, 2625-2634 (2002)
- 6) Kim, J.Y., Woo, H.J., Kim, Y.S., Kim, K.H., Lee, H.J. : Cell Cycle Dysregulation Induced by Cytoplasm of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in SNUC2A, a Colon Cancer Cell Line, *Nutr. Cancer*, **46**, 197-201 (2003)
- 7) Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., and Takano, T. : Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk, *J. Dairy Sci.*, **78**, 777-783 (1995)
- 8) Chabot, S., Yu, H., Le' se' leuc, L., Cloutier, D., Calsteren, M., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M., and Oth, D. : Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes, *Dairy Sci. and Techn.*, **81**, 683-697 (2001)
- 9) Nagata, Y., Hashiguchi, K., Kamimura, Y., Yoshida, and Gomyo, T. : The gastrointestinal Transit Tolerance of *Lactobacillus plantarum* Strain No.14 depended on the Carbon source, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2650-2655 (2009)
- 10) Nagata, Y., Yoshida, M., Kitazawa, H., Araki, E., and Gomyo, T. : Improvements in seasonal allergic disease with *Lactobacillus plantarum* No.14, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1869-1877 (2010)
- 11) Hodge, J. E. and Hofreiter, B. T. : Determination of reducing sugars and carbohydrates, In: Whistler R.L., Wolfrom M.L., Eds, *Method in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, New York, **1**, 380-394 (1962)
- 12) Kitson, R. E. and Mellon, R., G. : Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanado phosphoric acid, *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*, **16**, 379-83 (1944)
- 13) Dodson, K.S. : Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters, *Biochem. J.*, **78**, 312-319 (1961)
- 14) Salazar, N., Prieto, A., Leal, J.A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J.C., de los Reyes-Gavilan, C.G. and Ruas-Madiedo, P. : Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk, *J. Dairy Sci.*, **92**, 4158-4168 (2009)
- 15) Nakajima, H., Suzuki, Y., Kaizu, H., and Hirota, T. : Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk, *J. Food Sci.*, **57**, 1327-1329 (1992)
- 16) Kitazawa, H., Itoh, T., Tomioka, Y., Mizugaki, M., and Yamaguchi, T. : Induction of IFN- γ and IL-1 α production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Int. J. Food Microbiol.*, **31**, 99-106 (1996)
- 17) Tohno, M., Shimazu, T., Ueda, W., Anzawa, D., Aso, H., Nishikawa, J., Kawai, Y., Saito, Y., Saito, T., and Kitazawa, H. : Molecular cloning of porcine RP105/MD-1 involved in recognition of extracellular phosphopolysaccharides from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Mol. Immunol.*, **44**, 2566-2577 (2007)
- 18) Saito, K., Yajima, T., Nishimura, H., Aiba, K., Ishimitsu,

- R., Matsuguchi, T., Fushimi, T., Ohshima, Y., Tsukamoto, Y., and Yoshikai, Y. : Soluble branched β - (1,4) glucans from *Acetobacter* species show strong activities to induce interleukin-12 in vitro and inhibit T-helper 2 cellular response with immunoglobulin E production in vivo, *J. Biol. Chem.*, **278**, 38571-38578 (2003)
- 19) Makino, S., Ikegami, S., Kano, H., Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T., and Oda, T. : Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1, *J. Dairy Sci.*, **89**, 2873-2881 (2006)
- 20) Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T., and Itoh, T. : Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Int. J. Food Microbiol.*, **40**, 169-175 (1998)
- 21) Yamasaki-Miyamoto, Y., Yamasaki, M., Tachibana, H., and Yamada, K. : Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells, *J. Agric. Food. Chem.*, **57**, 8677-8682 (2009)
- 22) 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 乳酸菌学会編, 125-128, 354-360 (2010)

Chemical and immunological characterization of extracellular polysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* No.14.

Kenji Hashiguchi^{1)*}, Yuko Nagata¹⁾, Mutsuko Yoshida¹⁾,
Yo Murohushi²⁾, Haruki Kitazawa²⁾

¹⁾Research center, Momoya Co., Ltd,

²⁾Food Immunology Group, Laboratory of Animal Products Chemistry,
Graduate School of Agriculture Science, Tohoku University

Abstract

Extracellular polysaccharides (EPS) produced by *Lactobacillus plantarum* No.14 (LP14) were fractionated into neutral EPS (NPS), weakly acidic EPS (W-APS) and strongly acidic EPS (S-APS) by anion-exchange chromatography. The NPS was further fractionated into high molecular weight neutral EPS (H-NPS) and low molecular weight neutral EPS (L-NPS) by gel filtration chromatography. The W-APS and S-APS contained carboxyl group 0.76% and sulfate group 7.94%, respectively. H-NPS contained galactose (Gal), glucose (Glc) and rhamnose and L-NPS contained mannose (Man) and Glc in the molar ratio of 0.62 : 1.00 : 0.27 and 0.92 : 1.00, respectively. W-APS contained Gal, Man and Glc and S-APS contained Gal, Man and Glc in the ratio of 0.41 : 6.74 : 1.00 and 0.20 : 0.08 : 1.00, respectively. Mitogenic activity of all EPS as well as LP14 to Peyer's patch cells and mesenteric lymph node cells of swine were significantly higher than control. In conclusion, EPS produced by LP14 consisted of two NPS and two APS, and each EPS had a different sugar composition, furthermore all EPS and LP14 exert immunostimulatory activity on both Peyer's patch cells and mesenteric lymph node cells of swine. These findings suggest that EPS from LP14 has the possibility to have new physiological activities.