◇◇◇ コ ラ ム ◇◇◇

高校生物では「酵素の基質特異性には酵素分子と基質分子の立体構造がかかわる」という鍵と鍵穴の関係性を学び、大学では酵素の美しい3次元立体構造に魅了されつつ、酵素以外の生体分子においても、3次元構造の形成が分子機能を発揮するのに重要であること知る。

乳酸菌の「プロバイオティクス」機能のひとつとして免疫調節機能が挙げられ、免疫応答の調節を介し、さまざまな免疫疾患の軽減や感染症の予防が期待される。腸管粘膜免疫系において感染防御を担っている免疫グロブリンAの分泌の促進には、乳酸菌の刺激が寄与している。われわれの研究室では、免疫グロブリンAの分泌を促進する乳酸菌成分として、菌体外多糖を明らかにしている。しかしながら、菌体外多糖の構造とヒトへの機能性との関係を明らかに

するにあたり、菌体外多糖の分子構造を決定している乳酸菌の多糖合成機構の解明が不可避であった。未解明な部分が多い乳酸菌側の鍵と鍵穴の関係性を一つひとつ埋めていき、酵素機能や分子機能を明らかにしていくことが、乳酸菌の機能性の解明に重要なのではないかと考えている。

泌するEPSは食品添加物としてのニーズが高く⁽²⁾、さらにヒトへのさまざまな有用な機能性（コレステロール値低下作用、抗腫瘍作用、抗酸化活性、免疫賦活作用、プロバイオティクス作用など）を有していることから、近年、非常に注目されている^(3,4)。しかしながら、EPSの有用な特性は、産生する菌株の違いのみならず、その培養培地の組成の変化によっても違いが生じ、これら特性の異なるEPSの間において糖の組成、電荷、糖の結合様式、分子量に相違がみとめられることから、EPSの構造と機能の関係性の解明が重要な課題となっている⁽⁵⁻⁷⁾。これまでEPSの生合成機構は未解明な部分が多く、そのことが構造と機能の関係性への理解を妨げてきたが、近年のEPS生合成に関する研究の深化により、分子レベルでの関係性の解明が可能となってきている。本稿では乳酸菌が産生するEPSの生合成機構と構造との関係性、およびその機能性に関する最近の知見を解説したい。

EPSを産生する乳酸菌として、*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Leuconostoc*属、*Pediococcus*属、*Streptococcus*属、*Weissella*属、*Enterococcus*属、*Oenococcus*属などに属する菌種が報告されているが、先に述べたようにこれら乳酸菌の産生するEPSの化学構造は非常に変化に富んでいる。物性・存在様式など、さまざまな基準からの分類が可能であるが、ポリマーを構成している糖の組成による分類が一般的である^(4,8)。すなわち、ポリマーを構成している繰り返し単位およびその生合成機構によってEPSは大きくホモ多糖体(homopolysaccharide)とヘテロ多糖体(heteropolysaccharide)に大別

される。

ホモ多糖体

ホモ多糖体は単一の糖により構成された多糖であり、構成糖にはグルコースとフルクトースが挙げられ、分子量は $10^6 \sim 10^9$ Daの範囲で報告されている^(2,9)。ホモ多糖体には、 α -グルカン（D-グルコースが α -グリコシド結合したポリマー）、 β -フルクタン（D-フルクトースが β -グリコシド結合したポリマー）、そして β -グルカン（D-グルコースが β -グリコシド結合したポリマー）があり、その生合成反応は単一の酵素によって触媒される⁽⁸⁾（図1）。 α -グルカンと β -フルクタンは*Lactobacillus*属、*Leuconostoc*属、*Weissella*属、*Streptococcus*属乳酸菌の菌体外に分泌される酵素によって合成されるが、 β -グルカンは*Pediococcus*属、*Lactobacillus*属、*Oenococcus*属乳酸菌の細胞膜に結合した酵素によって菌体内で合成される。

1. α -グルカン

乳酸菌が産生するホモ多糖体のなかで最も一般的にみられるのが α -グルカンである。 α -グルカンは糖質関連酵素データベース(CAZy, <http://www.cazy.org>)の加水分解酵素ファミリー70(GH70)に属する酵素、グルコシルトランスフェラーゼによって合成される（図1a）。本酵素の触媒反応は、基質のアノマー型が生成物でも保持されるアノマー保持型の二置換機構(Double replacement mechanism)によって行われ、基質のスク

図1 ■ ホモ多糖体生成の模式図

a) α -グルカン生成 b) β -フルクタン生成
c) β -グルカン生成 GTF: グルコシルトランスフェラーゼ, FTF: フルクトシルトランスフェラーゼ

図2 ■ GH70 酵素のドメイン構造

a) GH70 酵素の amino 酸およびドメイン配列の比較 (GTF 180 とのアライメントにより予測)。分泌シグナルペプチドは灰色 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> で予測)、ドメイン V は赤、ドメイン IV は黄、ドメイン B は緑、ドメイン A は青、ドメイン C は紫で配色。黒三角は触媒残基を、星印はドメイン V の糖結合ポケットを示す。b) GH70 酵素のドメイン構造と作用機序。立体構造は *L. citreum* NRRL B-1299 由来デキストラン合成酵素 DSR-M (PBD:5NGY) より、a) の amino 酸配列に対応してドメインごとに配色 (PyMOL を用いて作製)。配色は a) と対応しており、N 末端はドメイン V から始まりドメイン C で折り返して C 末端はドメイン V に戻る。触媒ドメインであるドメイン A (青) は、連結する糖の結合様式に重要である。またグルカン結合ドメインであるドメイン V (赤) は複数の糖結合ポケットを持ち、ドメイン A から伸長してくる多糖の保持に重要である。

ロースを構成するグルコース基が、アクセプターであるグルコース鎖の非還元末端に転移付加し糖鎖を伸長させる。その酵素反応の特異性の違いにより、さまざまなタイプの α -グルカンが生成され、これまでに、 α -1,6 結合タイプ (デキストラン)、 α -1,3 結合タイプ (ムタン)、 α -1,4/1,6 結合タイプ (ロイテラン)、 α -1,3/1,6 交互結合タイプ (アルタナン)、 α -1,3/1,6 混合結合タイプなどが報告されており、さらにそれらの側鎖の割合や鎖長の変化によって、さまざまな物理化学特性をもつ α -グルカン

が生じる。2010 年に最初の GH70 酵素の結晶構造が *Lactobacillus reuteri* 180 由来の酵素において解析されて以来⁽¹⁰⁾、*Leuconostoc* 属、*Streptococcus* 属の酵素においても構造解析が行われ、生成する α -グルカンの違いに関与する酵素の構造基盤が明らかになってきている (図2)。

GH70 酵素は5つのドメイン (ドメイン A, B, C, IV, V) で構成されており、N 末端はドメイン V より始まり IV $\rightarrow$ B $\rightarrow$ A のあと、ドメイン C で折り返したのち再び A $\rightarrow$ B $\rightarrow$ IV と重なり、C 末端は再びドメイン V に戻る

(図2)．活性部位はドメインA, B間に位置し、触媒部位を構成する求核残基のアスパラギン酸残基、酸塩基触媒残基のグルタミン酸残基、酵素反応の遷移状態を安定化させるアスパラギン酸残基はGH70酵素において保存されているが⁽¹¹⁾、ドナーやアクセプター基質が結合するサブサイト-1, +1, +2のアミノ酸残基は酵素間で異なり、そのためさまざまな糖の結合様式が生じる^(12, 13)．

デキストランは、 α -1,6結合グルコース鎖に α -1,3結合したグルコースがランダムに付加した側鎖構造を有する α -グルカンである．Vujić-Zagarら(2010)⁽¹⁰⁾は、*Lactobacillus reuteri* 180由来デキストラン合成酵素GTF180の部分結晶構造解析とイソマルトース、イソマルトリオースとのドッキング解析により、ドナー基質の方向にアクセプター基質の6位の水酸基が位置する場合と、3位の水酸基が位置する場合があることを示し、1,3結合側鎖の形成反応における酵素の立体構造基盤を明らかにしている．同種異株の乳酸菌が産生するデキストランにおいて、水への溶解性や免疫増強活性が異なっており^(14, 15)、理由として α -1,6と α -1,3結合の割合が関与していると考えられている．その結果に基づいて、サブサイト部位の変異導入による機能性の改変も試みられている．

アルタナンは α -1,6結合と α -1,3結合とが交互に繰り返された直鎖状の α -グルカンであり、アルタナンの重要な物理化学特性である微粒子形成や低い粘性は、この交互繰り返し構造に由来する^(16, 17)．Molinaら(2019)⁽¹⁸⁾は*Leuconostoc citreum* NRRL B-1355由来のアルタナン合成酵素の結晶構造解析より、ドメインA, B間に存在する2か所のサブサイト+2 (Zone 1とZone 2)の存在が、繰り返し構造の生成に重要であることを見いだした．一方のZone 1には α -1,3結合のアクセプターが導入され、次のドナーとの結合の方向には6位の水酸基が位置する．対してZone 2には α -1,6結合のアクセプターが導入され、次のドナー側には3位の水酸基が位置する．このように複雑な繰り返し構造の生成が、酵素の立体構造に制御されていることが明らかとなっている．

GH70酵素のドメインVは触媒活性には関与しないが、糖鎖結合部位を有しており、長い鎖長の糖鎖を合成するのに重要なドメインである．Claverieら(2017)⁽¹⁹⁾は*Leuconostoc citreum* NRRL B-1299由来のデキストラン合成酵素DSR-Mを用いて、ドメインVの糖鎖結合部位が欠損した変異酵素が著しく鎖長の低下した多糖を合成することを示し、ドメインVの変異によって多糖の長さを制御できる可能性を明らかにしている．またMolinaら(2019)⁽¹⁸⁾も、*Leuconostoc citreum* NRRL B-1355由来

のアルタナン合成酵素ASRのドメインV欠損変異酵素を用い、プレバイオティクス効果の高い短鎖のデキストランのみを合成することに成功している．高分子デキストランは製パン業界においてグルテンフリーのパンの食感向上に利用され、他方、低分子デキストランはプレバイオティクス効果が認められている^(2, 20)．変異酵素を用いることにより目的の機能性をもつデキストランの安定生産が期待される．

2. β -フルクタン

乳酸菌が産生する β -フルクタンには β -2,6結合したフルクトース鎖のレバンと β -2,1結合したフルクトース鎖のイヌリンが存在する．ともに糖質関連酵素データベースの加水分解酵素ファミリー68 (GH68)に属する酵素、フルクトシルトランスフェラーゼによって合成される(図1b)．本酵素はGH70酵素と類似の触媒作用機構を有し、スクロースを構成するフルクトース基をフルクトース鎖に転移付加する酵素である．フルクトシルトランスフェラーゼの中でもレバンを合成する酵素はレバンスクララーゼ、イヌリンを合成する酵素はイヌロスクラーゼと呼ばれるが、触媒活性中心(求核残基のアスパラギン酸残基、酸塩基触媒残基のグルタミン酸残基、酵素反応の遷移状態を安定化させるアスパラギン酸残基)とアクセプター結合部位である+1, +2サブサイトの立体構造は共通して保存されており^(21, 22)、糖鎖結合様式(β -2,6または β -2,1結合)を決定するアミノ酸残基は、活性中心から離れた部位に存在する可能性が指摘されている⁽²²⁾．

Strubeら(2011)⁽²³⁾は*Bacillus megaterium*由来レバンスクララーゼにおいて、Charoenwongpaiboon(2019)⁽²⁴⁾らは*Lactobacillus reuteri*由来イヌロスクラーゼにおいて、生成するフルクタンが結合する連続したアミノ酸残基の存在を見いだし(サブサイト+3~+6)、これら結合部位の立体構造的な要素がフルクタンの鎖長決定に寄与していることを明らかにしている．フルクタンはレバン、イヌリンともにプレバイオティクス効果を有するが、その効果は鎖長によって異なるため、鎖長の制御は効果的なプレバイオティクス生産のために重要である．Biedrzyckaら(2004)⁽²⁵⁾は長鎖イヌリンよりも重合度2~8のイヌリン様オリゴ糖が*Bifidobacterium longum*および*Bifidobacterium animalis*に対する増殖作用が高いことを示し、他方van de Wieleら(2007)⁽²⁶⁾は、ヒト腸管モデルを用いて、重合度3~60のイヌリンが、重合度2~20のイヌリン様オリゴ糖よりも、生体調節機能を有する短鎖脂肪酸であるプロピオン酸・酪酸の腸内細菌に

よる誘導生産能が高いことを報告している。

3. β -グルカン

β -グルカンを産生する乳酸菌は、*Pediococcus parvulus*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus claussenii*, *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus diolivorans*, *Oenococcus oeni*において報告されており、いずれもアルコール飲料から単離されている。 β -グルカンの生合成機構は、他のホモ多糖体とは異なっている。 β -グルカンは、糖ヌクレオチドであるUDP-グルコースを糖供与体基質として膜結合型グルコシルトランスフェラーゼ（糖質関連酵素データベースの糖転移酵素ファミリー2に属する酵素）によって細胞内で合成されたのち、細胞外へ分泌される（図1c）。しかしながら細胞外への排出機構については十分に明らかにされていない^(27, 28)。これらの乳酸菌はいずれも、 β -1,3結合グルコース主鎖に β -1,2結合グルコース側鎖を有する β -グルカンを産生する^(28~32)。キノコや酵母の細胞壁成分である高分子 β -グルカン（直鎖状 β -1,3-グルコース鎖または β -1,6の分枝を含む β -1,3-グルコース鎖）は、腸管上皮細胞に発現している自然免疫受容体デクチン1（Dectin-1）のアゴニストとして免疫シグナルを活性化するのに対し^(33, 34)、海藻由来の低分子 β -グルカンはデクチン1のアンタゴニストとして免疫を抑制することが知られている⁽³⁵⁾。乳酸菌の産生する β -グルカンにおいても、自然免

疫受容体を介した機能性の発現が期待されている⁽³⁶⁾。

ヘテロ多糖体

ヘテロ多糖体は2種類以上の糖を構成成分とし、3~10糖からなる繰り返し単位が重合して作られる多糖であり、分子量は $10^4 \sim 10^6$ Daである^(2, 9)。主にグルコースやガラクトースが構成糖として存在するが、ほかにラムノース、*N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチルガラクトサミン、フコース、リボース、マンノース、*N*-アセチルマンノサミン、グルクロン酸などを含むヘテロ多糖体も報告されている^(6, 9)。単一の酵素によって生合成されるホモ多糖体と比べ、ヘテロ多糖体の生合成機構は非常に複雑で、その解明の遅れは、多くの研究者の憂えるところである⁽⁹⁾。肺炎球菌*Streptococcus pneumoniae*においては、90に及ぶセロタイプ（serotype）のヘテロ多糖体生合成にかかわるオペロンを比較解析した結果より、細胞膜の内側で合成されたオリゴ糖が膜の外側へと反転する、Wzx（フリッパーゼ）/Wzy（ポリメラーゼ）依存型のEPS生合成機構が提唱されている^(6, 9, 37, 38)。乳酸菌のヘテロ多糖体の生合成機構についてもこの*Streptococcus pneumoniae*やグラム陰性細菌のEPS生合成遺伝子クラスターと類似した遺伝子クラスターを有していることから、現在、図3aのようなヘテロ多糖体の生合成機構が*Lactococcus*属、*Lactobacillus*属、*Streptococ-*

図3 ■ヘテロ多糖体生合成の模式図

a) Wzx/Wzy 依存的 EPS 生合成機構が提唱されている^(6, 9, 37, 38)。b) ヘテロ多糖体の EPS 遺伝子クラスターおよび産生 EPS の繰り返し単位。遺伝子配列の模式図は *Streptococcus pneumoniae* D39 [NC_008533], *Streptococcus thermophilus* Sf6 [U40830.1], *Lactococcus lactis cremoris* NIZO B40 [AF036485.2] より、In silico Molecular Cloning（インシリコバイオロジー(株)）を用いて作製。

cus属に存在すると考えられている^(6, 9, 39)。その遺伝子クラスターにはEPS生合成のために重要な5つの構成要素、1) 糖スクレオチド合成酵素、2) グリコシルトランスフェラーゼ、3) アッセンブリータンパク質、4) リン酸化制御システム、5) 糖鎖修飾酵素が含まれている。

1. 糖スクレオチドの合成酵素

ヘテロ多糖体は、UDP-グルコース、UDP-ガラクトース、dTDP-ラムノースなどの糖スクレオチドを糖供与体基質とする糖転移酵素によって合成される。糖スクレオチドを合成する酵素の遺伝子はEPS合成遺伝子クラスターに含まれている場合もあるが(図3b)、糖スクレオチドの多くは細胞内のさまざまな生合成系における糖供与体として合成されており、これまでに報告されている11種類の構成糖のうち、少なくとも6種類の糖(ガラクトース、グルコース、ラムノース、*N*-アセチルグルコサミン、マンノース、リボース)は、細胞内の他の代謝系から供給された糖スクレオチドに由来していると考えられる⁽⁹⁾。そのため、ヘテロ多糖体の生合成は細胞内における糖およびエネルギー代謝系の影響を受けて、さらにEPSの生合成をコントロールする制御因子も存在する⁽⁹⁾。よって培地中の炭素源の違いによって生じる細胞内の代謝の変化は、EPSの生産量のみならず構成糖の組成^(40, 41)や分子量^(42~44)にも影響を与える。*Lactobacillus casei* CG11の産生するEPSは主にグルコース、ガラクトース、ラムノースを構成糖とするが、グルコースを炭素源とした場合と比較してラクトースを炭素源として菌を培養すると、収量は少ないがガラクトースの構成比が高いEPSが産生される⁽⁴⁰⁾。*Lactobacillus rhamnosus* E/Nはラムノース・マンノース・グルコース・ガラクトースを構成糖とするEPSを産生するが、炭素源をガラクトースからグルコースやラクトース、スクロース、マルトースなどに変えることによって構成糖の割合は変化し、またその抗酸化活性も変化する⁽⁴¹⁾。一方、*Lactobacillus fermentum* TDS030603の産生するガラクトースとグルコースを構成糖とするEPSにおいては、炭素源がガラクトース、ラクトース、グルコース、スクロースのいずれであっても糖組成に変化はなく、分子量とその粘性に変化が認められる⁽⁴³⁾。

2. グリコシルトランスフェラーゼ(糖転移酵素)

EPSの生合成は初めに、さまざまなグリコシルトランスフェラーゼによって糖供与体である糖スクレオチドから糖が順々に結合し、糖の繰り返し単位が合成される(図3a)。この反応は細胞膜成分であるウンデカプレニ

ルリン酸に、最初の糖スクレオチドの糖残基が1分子付加することから始まる。この反応を担う酵素はプライミング酵素と呼ばれ、糖スクレオチドの構成成分であるヘキソース1リン酸とウンデカプレニルリン酸との間のリン酸無水結合の形成反応を触媒する酵素である。本酵素はEPSの繰り返し単位を決定する最初の反応を担い^(45~47)、その後、この単糖が1残基付加したウンデカプレニルリン酸に対して、順次、さまざまなグリコシルトランスフェラーゼがさまざまな糖スクレオチドを糖供与体として作用し、糖の繰り返し単位が合成される。*Streptococcus thermophilus* Sf6のEPS合成遺伝子クラスターにおけるプライミング酵素はガラクトース1リン酸トランスフェラーゼ(galactosyl-1-P transferase)であり、その後、ガラクトシルトランスフェラーゼ(galactosyltransferase)、 α -1,3-*N*-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ(α -1,3-*N*-acetylgalactosaminyltransferase)、 β -1,3-グルコシルトランスフェラーゼ(β -1,3-glucosyltransferase)などのグリコシルトランスフェラーゼが作用する。そして合成される糖の繰り返し単位は、 $\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-[α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ となる^(6, 9, 45, 48, 49)(図3b)。一方、繰り返し単位が $\rightarrow 4$)- β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)[α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)] [α -D-Galp-1-PO₄-3]- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ であるEPSを産生する*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40においては、プライミング酵素のグルコース1リン酸トランスフェラーゼ(glucosyl-1-P transferase)と、グルコシルトランスフェラーゼ(glucosyltransferase)、ガラクトシルトランスフェラーゼ(galactosyltransferase)の活性が確認されている^(50~52)(図3b)。ヘテロ多糖体の生合成機構が存在していても内在する糖転移酵素または供給される糖スクレオチドの関与により、ガラクトースのみを構成糖とするホモ多糖体も生成されることが*Lactobacillus delbrueckii*や*Lactobacillus lactis*で報告されている^(5, 52)。EPSの構成糖の違いは、その生理活性および物性にも影響を与え^(53, 54)、先に述べたような抗酸化活性⁽⁴¹⁾のみならず抗腫瘍活性⁽⁵⁵⁾への影響も報告されている。*Lactobacillus plantarum* 70810は等しい分子量で構成糖(グルコース・マンノース・ガラクトース)の比率の異なる2種類のEPSを産生するが、それらは抗酸化活性と抗腫瘍活性に違いが認められる⁽⁵⁵⁾。また*Lactobacillus helveticus* MB2-1においても構成糖(グルコース・マンノース・ガラクトース)の比率の異なる3種類のEPSを産生し、抗ガン活性が大きく異なる⁽⁵⁶⁾。物性に関して、Tuinierら(2001)⁽⁵³⁾は、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B39由来

の7糖の繰り返し単位からなるヘテロ多糖体において、側鎖末端のガラクトース残基を除去することによって、粘性の重要なファクターである鎖剛直性が低下することを明らかにしている。

3. アッセンブリータンパク質

合成された糖の繰り返し単位はフリッパーゼ (Wzx) によって細胞膜の内から外へ移行され、その後ポリメラーゼ (Wzy) によって各繰り返し単位の重合が行われ、さらに制御因子 (EpsA) によってペプチドグリカン層への移行が調節されていると推測されている。これらの遺伝子はアッセンブリー機能を有する遺伝子群として区分されているが⁽⁶⁷⁾、乳酸菌においてはいずれの酵素の機能もいまだ解析されていない。しかしながら、それら遺伝子の欠損はEPS生産に大きな影響を与える。*Lactobacillus johnsonii* FI9785はホモ多糖体とヘテロ多糖体の両方を産生するが、EpsA欠損によって両方の産生能が失われることから、EpsAは正の制御因子と推測されている⁽⁵⁸⁾。

4. リン酸化制御システム

遺伝子クラスターの解析から、ヘテロEPS生合成機構にはリン酸化による制御システムの存在が推測されている。*Streptococcus pneumoniae*においてこのシステムを司るタンパク質はCpsB、C、Dと呼ばれ、CpsC (transmembrane activation protein) とCpsD (チロシンキナーゼ) によって構築される自己リン酸化複合体はCpsB (ホスホチロシンホスファターゼ) によって制御されている。構成する3つの遺伝子群は乳酸菌の間で保存されているが、その機能解析はまだ一部でしかなされていない^(38, 59, 60)。Cefaloら(2013)⁽⁶¹⁾は、*Streptococcus thermophilus* MR-1C由来Wzh (*Streptococcus pneumoniae*のCpsBに対応) の大腸菌発現組み換え酵素においてホスホチロシンホスファターゼ活性を確認している。いくつかの研究結果から、このリン酸化制御システムはEPS生産量およびEPSの鎖長に影響を与えることが示唆されている。Benderら(2003)⁽⁶²⁾は*Streptococcus pneumoniae*のCpsC-D欠損株は、分子量の大きいEPSの産生能を失うことを報告している。また、Liら(2016)⁽⁴⁴⁾も、*Streptococcus thermophilus* 05-34の産生するEPSにおいて、分子量の増加に伴いEpsC (*Streptococcus pneumoniae*のCpsCに対応) 遺伝子の発現量が増加していることが示され、EpsCが多糖の重合度を増加させると推察している。EPSの分子量の増加は、粘性の増加に寄与する^(54, 63, 64)。Higashimuraら(2000)⁽⁶⁴⁾は、

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* SBT0495の産生するヘテロ多糖体EPSおよびソニケーションによる低分子化EPSを用いて、分子量と固有粘度との正の相関を明確にしている。他方、*Bifidobacterium*の産生するEPSや酵母由来の β グルカンにおいては低分子化によって抗酸化活性が高くなることが知られており^(65, 66)、その効果は低分子化による還元末端(ヘミアセタール水酸基)の増加が寄与していると推測されている⁽⁶⁾。*Weissella cibaria* GA44や*Lactobacillus plantarum* C88などの乳酸菌が産生するEPSについても抗酸化活性が報告されており^(67, 68)、低分子化による活性の向上が期待できる。

5. 糖鎖修飾酵素

乳酸菌の産生するEPSには、アセチル基、リン酸基、ピルボイル基、グリセロールリン酸によって修飾されているヘテロ多糖体が存在する。これらの糖鎖修飾に関与する酵素としては、AcetyltransferaseやPyruvoyltransferaseなどの遺伝子が、*Streptococcus thermophilus*のEPS合成遺伝子クラスターにて確認されており、それらの酵素の寄与が示唆されるが^(6, 59) (図3)、酵素の機能解析および修飾メカニズムの解明はいまだ途上である。しかしながら、これら糖の修飾基が、EPSの機能性に与える影響については、置換基の付加または除去によって、解析が進んでいる。酸性基の付加によって負に帯電したEPSは、ヨーグルト製造時に正に帯電したタンパク質と相互作用をすることによって粘性を向上させる⁽⁶⁹⁾。また酸性のEPSによるマクロファージやリンパ球の活性化におけるリン酸基の重要性は、リン酸基を化学的に除去したEPSに顕著な活性の低下が認められることから明らかである^(70, 71)。酸性基の付加による抗腫瘍、抗酸化などの生理活性の向上効果は、水への溶解度が向上して生理活性を誘導する酵素やレセプターへのアクセスが容易になること、修飾基の付加によって生理活性の誘導に最適な立体構造に変化すること、などの理由が推測されている⁽⁶⁾。

おわりに

近年、乳酸菌が産生するEPSの有する機能性への関心の高まりに伴い、微生物学以外の分野においても精力的にその応用研究がおこなわれ、今後EPSの利用の可能性がさらに広がると考えられる。そのEPSの機能性に影響を与えている生合成機構について、他分野の学生や研究者の方々にも関心をもっていただけたらと思い、解説させていただいた。未解明な部分の残る生合成機構

研究ではあるが、本解説がEPSの応用研究を志す学生や研究者の方々の参考に、少しでもなればと考えている。

文献

- 1) European Food Safety Authority (EFSA): *EFSA J.*, **11**, 3449 (2013).
- 2) M. I. Torino, G. Font de Valdez & F. Mozzi: *Front. Microbiol.*, **6**, 834 (2015).
- 3) E. Zannini, D. M. Waters, A. Coffey & E. K. Arendt: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 1121 (2016).
- 4) Y. R. Saadat, A. Y. Khosroushahi & B. P. Gargari: *Carbohydr. Polym.*, **217**, 79 (2019).
- 5) F. Mozzi, F. Vaningelgem, E. M. Hébert, R. Van der Meulen & M. R. F. Moreno: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 4431 (2006).
- 6) Y. Zhou, Y. Cui & X. Qu: *Carbohydr. Polym.*, **207**, 317 (2019).
- 7) S. A. van Hijum, S. Kralj, L. K. Ozimek, L. Dijkhuizen & I. G. van Geel-Schutten: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 157 (2006).
- 8) P. M. Ryan, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, N. M. Caplice & C. Stanton: *Food Funct.*, **6**, 679 (2015).
- 9) A. A. Zeidan, V. K. Poulsen, T. Janzen, P. Buldo, P. M. Derkx, G. Øregaard & A. R. Neves: *FEMS Microbiol. Rev.*, **41**(Supp_1), S168 (2017).
- 10) A. Vujičić-Žagar, T. Pijning, S. Kralj, C. A. López, W. Eeuwema, L. Dijkhuizen & B. W. Dijkstra: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 21406 (2010).
- 11) M. Miao, B. Jiang, Z. Jin & J. N. BeMiller: *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **17**, 1238 (2018).
- 12) H. Leemhuis, T. Pijning, J. M. Dobruchowska, B. W. Dijkstra & L. Dijkhuizen: *Biocatal. Biotransform.*, **30**, 366 (2012).
- 13) Y. Bai, J. Gangoiti, B. W. Dijkstra, L. Dijkhuizen & T. Pijning: *Structure*, **25**, 231 (2017).
- 14) K. Wangpaiboon, N. Waiyaseesang, P. Panpetch, T. Charoenwongpaiboon, S. A. Nepogodiev, S. Ekgasit, R. A. Field & R. Pichyangkura: *Int. J. Biol. Macromol.*, **152**, 473 (2020).
- 15) C. Matsuzaki, K. Matsumoto, T. Katoh, K. Yamamoto & K. Hisa: *Biosci. Microb. Food H.*, **35**, 51 (2016).
- 16) K. Wangpaiboon, P. Padungros, S. Nakapong, T. Charoenwongpaiboon, M. Rejzek, R. A. Field & R. Pichyangkura: *Sci. Rep.*, **8**, 8340 (2018).
- 17) G. L. Cote: *Carbohydr. Polym.*, **19**, 249 (1992).
- 18) M. Molina, C. Moulis, N. Monties, S. Pizzut-Serin, D. Guieysse, S. Morel, G. Cioci & M. Remaud-Siméon: *ACS Catal.*, **9**, 2222 (2019).
- 19) M. Claverie, G. Cioci, M. Vuillemin, N. Monties, P. Roblin, G. Lippens, M. Remaud-Simeon & C. Moulis: *ACS Catal.*, **7**, 7106 (2017).
- 20) S. Galle & E. K. Arendt: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **54**, 891 (2014).
- 21) G. Meng & K. Fütterer: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **10**, 935 (2003).
- 22) T. Pijning, M. A. Anwar, M. Böger, J. M. Dobruchowska, H. Leemhuis, S. Kralj, L. Dijkhuizen & B. W. Dijkstra: *J. Mol. Biol.*, **412**, 80 (2011).
- 23) C. P. Strube, A. Homann, M. Gamer, D. Jahn, J. Seibel & D. W. Heinz: *J. Biol. Chem.*, **286**, 17593 (2011).
- 24) T. Charoenwongpaiboon, T. Sitthiyotha, P. P. N. Ayuthaya, K. Wangpaiboon, S. Chunsriviro, M. H. Prousoontorn & R. Pichyangkura: *Carbohydr. Polym.*, **209**, 111 (2019).
- 25) E. Biedrzycka & M. Bielecka: *Trends Food Sci. Technol.*, **15**, 170 (2004).
- 26) T. van De Wiele, N. Boon, S. Possemiers, H. Jacobs & W. Verstraete: *J. Appl. Microbiol.*, **102**, 452 (2007).
- 27) T. Karnezis, M. McIntosh, A. Z. Wardak, V. A. Stanisich & B. A. Stone: *Trends Glycosci. Glyc.*, **12**, 211 (2000).
- 28) M. L. Werning, S. Notararigo, M. Nacher, P. Fernández de Palencia, R. Aznar & P. López: *Food Additives*, 83 (2012).
- 29) R. M. Llauberes, B. Richard, A. Lonvaud, D. Dubourdieu & B. Fournet: *Carbohydr. Res.*, **203**, 103 (1990).
- 30) M. T. Dueñas-Chasco, M. A. Rodríguez-Carvajal, P. T. Mateo, G. Franco-Rodríguez, J. Espartero, A. Irastorza-Iribas & A. M. Gil-Serrano: *Carbohydr. Res.*, **303**, 453 (1997).
- 31) I. Ibarburu, M. E. Soria-Díaz, M. A. Rodríguez-Carvajal, S. E. Velasco, P. Tejero-Mateo, A. M. Gil-Serrano, A. Irastorza & M. T. Dueñas: *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 477 (2007).
- 32) M. E. Fraunhofer, A. J. Geissler, D. Wefers, M. Bunzel, F. Jakob & R. F. Vogel: *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**(Pt A), 874 (2018).
- 33) G. D. Brown, P. R. Taylor, D. M. Reid, J. A. Willment, D. L. Williams, L. Martinez-Pomares, S. Y. C. Wong & S. Gordon: *J. Exp. Med.*, **196**, 407 (2002).
- 34) S. Cohen-Kedar, L. Baram, H. Elad, E. Brazowski, H. Guzman-Gur & I. Dotan: *Eur. J. Immunol.*, **44**, 3729 (2014).
- 35) C. Tang, T. Kamiya, Y. Liu, M. Kadoki, S. Kakuta, K. Oshima, M. Hattori, K. Takeshita, T. Kanai, S. Saijo *et al.*: *Cell Host Microbe*, **18**, 183 (2015).
- 36) G. Garai-Ibabe, M. T. Dueñas, A. Irastorza, E. Sierra-Filardi, M. L. Werning, P. López, L. Corbí & P. F. de Palencia: *Bioresour. Technol.*, **101**, 9254 (2010).
- 37) S. D. Bentley, D. M. Aanensen, A. Mavroidi, D. Saunders, E. Rabinowitsch, M. Collins, K. Donohoe, D. Harris, L. Murphy, M. A. Quail *et al.*: *PLoS Genet.*, **2**, e31 (2006).
- 38) J. Nourikyan, M. Kjos, C. Mercy, C. Cluzel, C. Morlot, M. F. Noirot-Gros, S. Guiral, J. P. Lavergne, J. W. Veening & C. Grangeasse: *PLoS Genet.*, **11**, e1005518 (2015).
- 39) Y. Wei, F. Li, L. Li, L. Huang & Q. Li: *Front. Microbiol.*, **10**, 2898 (2019).
- 40) J. C. M. C. Cerning, C. M. G. C. Renard, J. F. Thibault, C. Bouillanne, M. Landon, M. Desmazeaud & L. Topisirovic: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3914 (1994).
- 41) M. Polak-Berecka, A. Wasko, D. Szwajgier & A. Choma: *Pol. J. Microbiol.*, **62**, 181 (2013).
- 42) G. J. Grobben, W. H. M. van Casteren, H. A. Schols, A. Oosterveld, G. Sala, M. R. Smith, J. Sikkema & J. A. M. de Bont: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 516 (1997).
- 43) K. Fukuda, T. Shi, K. Nagami, F. Leo, T. Nakamura, K. Yasuda, A. Senda, H. Motoshima & T. Urashima: *Carbohydr. Polym.*, **79**, 1040 (2010).
- 44) D. Li, J. Li, F. Zhao, G. Wang, Q. Qin & Y. Hao: *Food Chem.*, **197**(Pt A), 367 (2016).
- 45) F. Stingle, J. W. Newell & J. R. Neeser: *J. Bacteriol.*, **181**, 6354 (1999).

- 46) L. Pelosi, M. Boumedienne, N. Saksouk, J. Geiselmann & R. A. Geremia: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**, 857 (2005).
- 47) M. Dimopoulou, O. Claisse, L. Dutilh, C. Miot-Sertier, P. Ballestra, P. M. Lucas & M. Dols-Lafargue: *Mol. Biotechnol.*, **59**, 323 (2017).
- 48) F. Stingle, J. R. Neeser & B. Mollet: *J. Bacteriol.*, **178**, 1680 (1996).
- 49) F. Stingle, S. J. Vincent, E. J. Faber, J. W. Newell, J. P. Kamerling & J. R. Neeser: *Mol. Microbiol.*, **32**, 1287 (1999).
- 50) R. van Kranenburg, J. D. Marugg, I. I. van Swam, N. J. Willem & W. M. de Vos: *Mol. Microbiol.*, **24**, 387 (1997).
- 51) R. van Kranenburg, I. I. van Swam, J. D. Marugg, M. Kleerebezem & W. M. de Vos: *J. Bacteriol.*, **181**, 338 (1999).
- 52) R. van Kranenburg, H. R. Vos, I. I. van Swam, M. Kleerebezem & W. M. de Vos: *J. Bacteriol.*, **181**, 6347 (1999).
- 53) R. Tuinier, W. H. M. van Casteren, P. J. Looijesteijn, H. A. Schols, A. G. J. Voragen & P. Zoon: *Biopolymers*, **59**, 160 (2001).
- 54) P. Ruas-Madiedo, J. Hugenholtz & P. Zoon: *Int. Dairy J.*, **12**, 163 (2002).
- 55) K. Wang, W. Li, X. Rui, X. Chen, M. Jiang & M. Dong: *Int. J. Biol. Macromol.*, **67**, 71 (2014).
- 56) W. Li, W. Tang, J. Ji, X. Xia, X. Rui, X. Chen, M. Jiang, J. Zhou & M. Dong: *Carbohydr. Res.*, **411**, 6 (2015).
- 57) Y. Kawai, J. Marles-Wright, R. M. Cleverley, R. Emmins, S. Ishikawa, M. Kuwano, N. Heinz, N. K. Bui, C. N. Hoyland, N. Ogasawara *et al.*: *EMBO J.*, **30**, 4931 (2011).
- 58) E. Dertli, M. J. Mayer, I. J. Colquhoun & A. Narbad: *Microb. Biotechnol.*, **9**, 496 (2016).
- 59) Q. Wu, H. M. Tun, F. C. C. Leung & N. P. Shah: *Sci. Rep.*, **4**, 4974 (2014).
- 60) C. Grangeasse: *Trends Microbiol.*, **24**, 713 (2016).
- 61) A. D. Cefalo, J. R. Broadbent & D. L. Welker: *Can. J. Microbiol.*, **59**, 391 (2013).
- 62) M. H. Bender, R. T. Cartee & J. Yother: *J. Bacteriol.*, **185**, 6057 (2003).
- 63) E. J. Faber, P. Zoon, J. P. Kamerling & J. F. Vliegthart: *Carbohydr. Res.*, **310**, 269 (1998).
- 64) M. Higashimura, B. W. Mulder-Bosman, R. Reich, T. Iwasaki & G. W. Robijn: *Biopolymers*, **54**, 143 (2000).
- 65) R. Xu, Q. Shen, X. Ding, W. Gao & P. Li: *Eur. Food Res. Technol.*, **232**, 231 (2011).
- 66) N. Lei, M. Wang, L. Zhang, S. Xiao, C. Fei, X. Wang, K. Zhang, W. Zheng, C. Wang, R. Yang *et al.*: *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 21575 (2015).
- 67) A. T. Adesulu-Dahunsi, A. I. Sanni & K. Jeyaram: *Lebensm. Wiss. Technol.*, **87**, 432 (2018).
- 68) L. Zhang, C. Liu, D. Li, Y. Zhao, X. Zhang, X. Zeng, Z. Yang & S. Li: *Int. J. Biol. Macromol.*, **54**, 270 (2013).
- 69) M. C. Gentès, D. St-Gelais & S. L. Turgeon: *Dairy Sci. Technol.*, **91**, 645 (2011).
- 70) H. Kitazawa, T. Harata, J. Uemura, T. Saito, T. Kaneko & T. Itoh: *Int. J. Food Microbiol.*, **40**, 169 (1998).
- 71) C. Hidalgo-Cantabrana, P. López, M. Gueimonde, G. Clara, A. Suárez, A. Margolles & P. Ruas-Madiedo: *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **4**, 227 (2012).

プロフィール

松崎 千秋 (Chiaki MATSUZAKI)

＜略歴＞1995年神戸大学農学部園芸農学科卒業／1997年同大学大学院自然科学研究科博士前期課程修了／2012年石川県立大学大学院生物資源環境学研究科博士後期課程修了／同年同大学生物資源工学研究所研究員／2016年同大学生物資源工学研究所助教／2020年同大学生物資源工学研究所講師，現在に至る＜研究テーマと抱負＞乳酸菌による免疫誘導＜趣味＞ジョギング，娘のお弁当作り

Copyright © 2021 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.59.7