

[生物工学会誌 第75巻 第2号 125-133, 1997]

総 説

乳酸菌が生産する増殖阻害物質, バクテリオシン

松崎 弘美¹・園元 謙二²・石崎 文彬^{2*}理化学研究所,¹九州大学農学部食糧化学工学科²¹〒351-01 埼玉県和光市広沢2-1²〒812-81 福岡市東区箱崎6-10-1

Bacteriocins, Growth Inhibitory Substances, of Lactic Acid Bacteria —Review—

HIROMI MATSUSAKI,¹ KENJI SONOMOTO,² and AYAOKI ISHIZAKI^{2*} (*The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-01¹; Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-81²*) *Seibutsu-kogaku* 75: 125-133, 1997.

Lactic acid bacteria have been traditionally used for the fermentation of foods and beverages because of their contribution to flavor and aroma development and to spoilage retardation. The preservative effect of lactic acid bacteria during the manufacture and subsequent storage of fermented foods is mainly due to the acidic conditions that they create in converting carbohydrates to organic acids (lactic acid and acetic acid) in the food during their development. Recently, it has become clear that lactic acid bacteria can produce and excrete inhibitory substances, such as hydrogen peroxide, diacetyl, and bacteriocins, in addition to organic acids. Bacteriocins can be biologically active proteins or protein complexes displaying a bactericidal mode of action towards Gram-positive bacteria, and particularly towards closely related species. Because bacteriocins are degraded and inactivated in the human alimentary canal and lactic acid bacteria have been used in foods since ancient times, bacteriocins are used as natural food preservatives. As such, they have been the subject of a considerable amount of research. We outline here recent studies on bacteriocins, mainly nisin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

[Key words: bacteriocin, nisin, lactic acid bacteria, *Lactococcus*, food preservatives]

はじめに

乳酸菌 (lactic acid bacteria) は、糖を発酵し、多量の乳酸を生産する細菌の総称であり、古来から人間の生活に深く関係してきた。たとえば、乳酸 (菌) 飲料、チーズ、醤油、味噌、酒など伝統的発酵食品の製造に利用され、食品の保存性を高めてきた。また、種々の漬け物や発酵調味料などに、乳酸発酵による良好なテクスチャーやフレーバーを与えてきた。このように、私たち人類は乳酸菌をそれと知らず、巧みに利用してきたのである。しかしながら、乳酸菌が複雑な栄養要求性をもつなどの理由から、好気性菌や他の微好気性

菌のような活発な研究が展開されず、乳酸菌の種類と役割が明らかにされてきたのは、ここ100年のことである。

乳酸菌の食品保存効果は乳酸発酵における pH の低下が第一要因であるが、それ以外に、乳酸菌が生産するさまざまな増殖阻害物質が食品汚染菌の生育を抑制あるいは阻害していることが近年明らかとなってきた。これら増殖阻害物質には、乳酸などの有機酸、過酸化水素、ジアセチルおよび低分子のタンパク質性の物質 (バクテリオシン) などがあり、これらの物質が発酵食品中の安定したマイクロフローラ (菌叢) の形成に関与しているものと考えられる。特に、バクテリオシン¹⁻⁴⁾ は一般的に生産菌に近縁のグラム陽性菌に対して抗菌作用を示す耐熱性の物質であるが、中には食

* 連絡先, Corresponding author.

中毒の原因にもなる食品汚染菌のリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*), ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*), 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) などをはじめとするグラム陽性菌全般に広く抗菌作用を示すものもある。このようなバクテリオシンはヒトの腸管にある消化酵素により分解されるだけでなく、乳酸菌が昔から広く食品に利用されて安全性が高いことから、天然の食品保存料として期待されている。したがって、さまざまなバクテリオシンについて、生産菌のスクリーニングだけでなく物質の単離・精製・構造解析および感受性菌への増殖阻害作用機作、生合成遺伝子の解析と生合成・分泌プロセスの分子機構など幅広い研究が精力的に行われるようになってきた。

本論では、乳酸菌のバクテリオシンについて概説した後、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が生産するナisinを中心最近の研究の進展を紹介する。

1. バクテリオシンの分類

乳酸菌が生産するバクテリオシンはその構造や性質の違いにより以下のように4種類に大別されている。³⁾

(I) ランチビオティック (lantibiotic); 不飽和アミノ酸、ランチオニン、3-メチルランチオニンなどの異常アミノ酸を含む耐熱性低分子ペプチド (<5 kDa)。

nisin,⁵⁾ lactacin 481,⁶⁾ lactocin S,⁷⁾ carnocin UI49⁸⁾ などがある。

(II) ランチオニンを含まない耐熱性の低分子ペプチド (<10 kDa); このバクテリオシンプレカーサーは Gly⁻²-Gly⁻¹-Xaa⁺¹ のプロセッシング部位をもつ。このクラスはさらに3つのサブグループに分けることができる。

(II a) N末端側にコンセンサス配列 (-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-) を有する抗リステリア活性ペプチド。

pediocin PA-1,⁹⁾ sakacin A,¹⁰⁾ sakacin P,¹¹⁾ leucocin A,¹²⁾ curvacin A¹¹⁾ などがある。

(II b) 2分子のペプチド複合体を形成して抗菌活性を示す。

lactococcin G,¹³⁾ lactococcin M,¹⁴⁾ lactacin F¹⁵⁾ などがある。

(II c) 抗菌活性に還元型のシステイン残基が必要。
lactococcin B¹⁶⁾

(III) 熱感受性の高分子タンパク質 (>30 kDa)

helveticin J,¹⁷⁾ helveticin V-1829,¹⁸⁾ acidophilucin A,¹⁹⁾

lactacin A,²⁰⁾ lactacin B²⁰⁾ などがある。

(IV) タンパク質分子以外 (糖質や脂質) と複合体を形成して抗菌活性を示す。

plantaricin S,²¹⁾ leuconocin S,²²⁾ lactocin 27,²³⁾ pediocin SJ-1²⁴⁾ などがある。

乳酸菌の多くは、古くから食品として利用されてきたものや、動物の腸管から分離されたものなどであり、腸内における乳酸菌の整腸作用にも、乳酸菌が生産する抗菌物質が寄与していると考えられる。したがって、上に挙げたようなバクテリオシンを食品の保存性向上に利用しようとする研究が行われるようになった。バクテリオシンの中でももっとも産業的に重要で唯一実用化されているのは、ランチビオティック (クラス I) に属するナisin (nisin)⁵⁾ である。ナisinは、1969年にFAO (Food and Agriculture Organization) とWHO (World Health Organization) の食品添加物についての共同委員会会議で安全な食品保存料として認められ、²⁵⁾ 現在約50ヶ国で食品保存料として、プロセスチーズ、野菜や果物の缶詰、ミルク、マヨネーズなどに使用されている。²⁶⁾

2. ナisinの生合成と構造

ナisinは通常のタンパク質と同様に、まずリボソームで57個のアミノ酸からなるプレカーサーペプチド (prenisin) として合成される。そのプレカーサーペプチド中のセリンとスレオニンが脱水されて、それぞれ、デヒドロアラニン、デヒドロプロチリンとなり、これら不飽和アミノ酸がシステインと分子内縮合してチオエーテル環 (モノスルフィド結合) を有するランチオニンと3-メチルランチオニンにそれぞれ変化すると考えられている。^{27,28)} 最後にN末端側のリーダーペプチドが切断されて、²⁸⁾ 34個のアミノ酸から構成される活性型ナisin (Fig. 1) が菌体外に分泌される。このようなナisinの生合成、特にプレカーサーナisin修飾酵素、すなわち異常アミノ酸生合成酵素^{30,31)} およびプロセッシング酵素^{31,32)} に関する遺伝子工学的研究はもっとも盛んに行われている。その結果、Fig. 2に示すようにナisin生合成遺伝子はオペロンを形成しており、³³⁻³⁵⁾ 部位特異的変異やデータベース検索などからその役割が次第にわかりかけている (Table 1)。また最近、活性型のナisinがシグナル伝達分子として機能し、ナisin構造遺伝子 (*nisA*) の転写が調節されることが明らかにされた (Fig. 3)。³⁶⁾ しかしながら、完全にナisinの生合成機構が証明されている

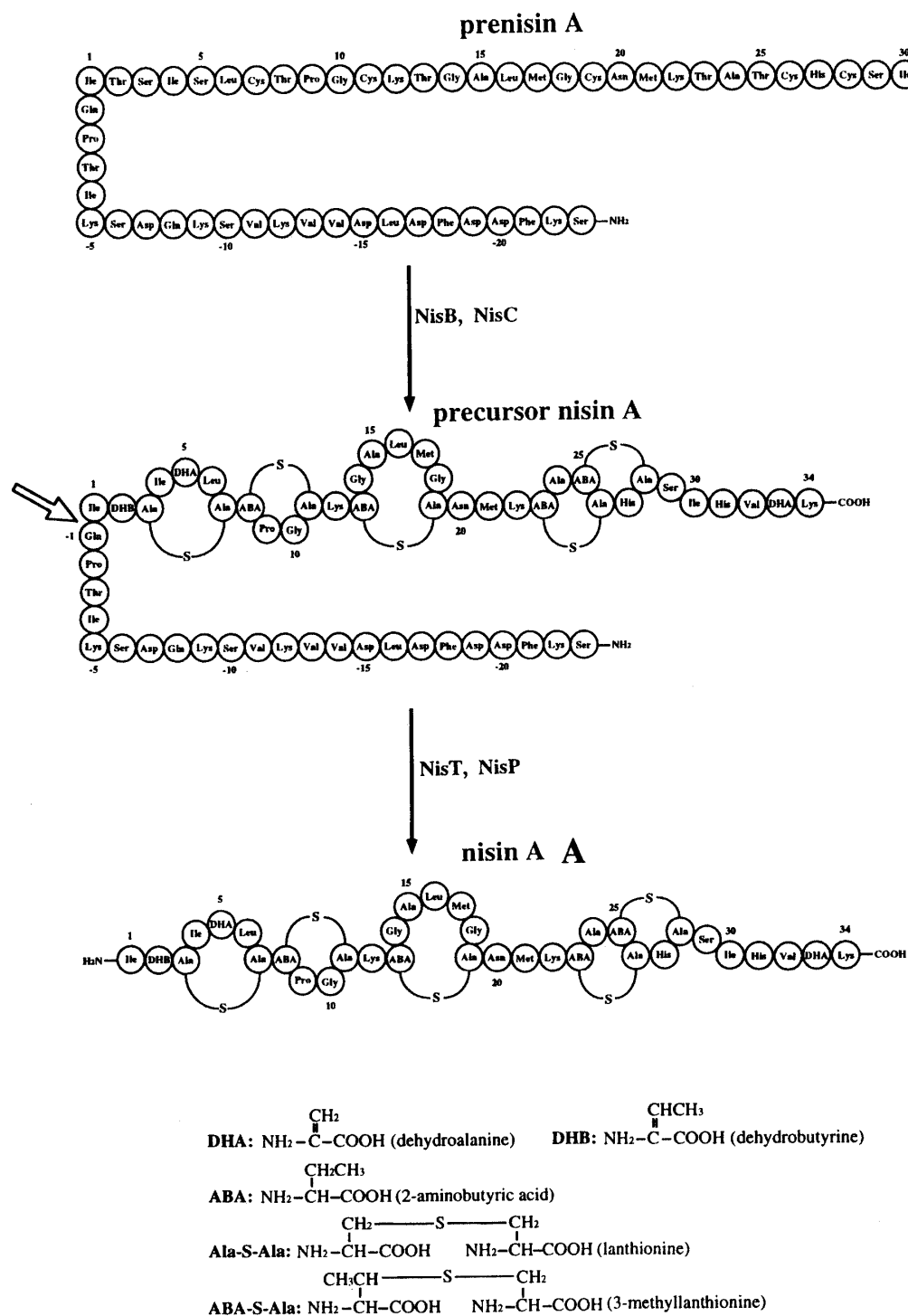


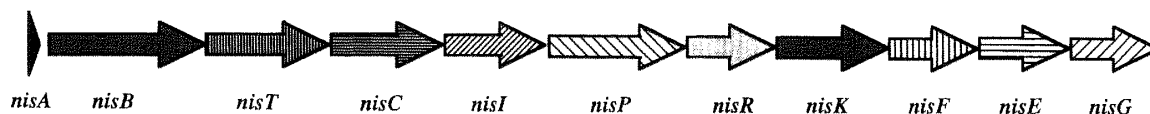
Fig. 1. Biosynthesis of nisin A. The white arrow indicates processing of the leader peptide by the action of NisP. Nisin Z differs in a single amino acid residue at position 27 (His in nisin A and Asn in nisin Z).

わけではなく、生合成酵素の立体特異性もいまだ不明である。

3. ナイシンの精製と構造解析

前述したように、ナイシンの生合成機構が完全に解

明しているわけではない。したがって、ナイシンのように異常アミノ酸を含むランチビオティックの構造を決定する際には、構造遺伝子配列から推察されるアミノ酸配列だけでは不十分であり、目的物質の単離・精製後に活性型ペプチドの構造解析を行うことが必須と

Fig. 2. Organization of the nisin A operon.³³⁻³⁵⁾

なる。ナisin A は、1947年に Mattick と Hirsh³⁷⁾によりクロロホルムとオクタノールで抽出され、単離されたが、わずか2～4%の回収率であった。その後、向流分配法をはじめとする溶媒抽出法が用いられてきた。³⁸⁻⁴¹⁾これらの精製物にはナisin A 以外のいくつかの不純物が含まれていたが、Bailey と Hurst⁴²⁾は、陰イオン交換クロマトグラフィー、pH 勾配クロマトグラフィーなどを行って、電気泳動的に単一に精製されたナisin A を得ている。最近では、逆相系的高速液体クロマトグラフィーを用いることにより、高純度で精製できるようになった。^{29,43)}

ナisin のようなランチビオティックは、その分子内に不飽和アミノ酸やチオエーテル環が存在する。これらは、エドマン分解できないため、自動アミノ酸シーケンサーを用いて、ランチビオティックの全構造を明らかにすることができなかった。しかし、近年になって精製法も改良され、さらに核磁気共鳴(NMR)による構造解析が盛んに行われるようになり、epidermin,⁴⁴⁾ galidermin,⁴⁵⁾ Pep5⁴⁶⁾などの構造が明らかにされた。

NMR による分析は、現在微量のサンプルで行うことができつつあるものの、一般的には一次元の¹H-NMR でさえ数 mg の精製物を必要とし、二次元分析になると10 mg ほどを要す。したがって、ナisin 様の抗菌物質の構造決定を行う際、効率的に精製する必要がある。また、その構造解析も従来より煩雑である。しかしながら、最近 Meyer ら⁴⁷⁾はランチビオティックをエタンチオールなどを用いて前処理することにより、エドマン分解が可能となることを見いだした。これにより、数 nmol のランチビオティックでエドマン分解による構造決定が可能となった。

4. ナisin の性質

ナisin A は食品保存料として唯一実用化されているバクテリオシンであり、²⁵⁾多くのグラム陽性菌に対して抗菌作用を示す。その作用機作は陽イオン性の界面活性剤的作用により、細菌の細胞表面に付着し、標的である細胞膜に作用して、孔を穿ち、ATP やカリウムイオンなど細胞内物質の漏出、呼吸活性の阻害

Table 1. Genes and sequence characteristics of nisin A operon.

Feature	Putative number of amino acids	Description
<i>nisA</i>	57	Structural gene for nisin A precursor.
<i>nisB</i>	993	117 kDa protein homologous to SpaB and EpiB, several C terminal amphipathic transmembrane helices and associated with membrane fractions. ³⁰⁾ NisB provides an essential processing/maturation function; dehydration reaction.
<i>nisT</i>	600	64 kDa ATP-dependent membrane translocator with homology to HlyB. ³⁰⁾
<i>nisC</i>	418	43.7 kDa protein with homology to SpaC and EpiC, essential for biosynthesis of subtilin and epidermin. ³⁰⁾
<i>nisI</i>	245	Lipoprotein that confers nisin immunity. ³³⁾
<i>nisP</i>	683	Subtilisin-like serine protease thought to cleave the nisin precursor to form mature nisin. ³²⁾
<i>nisR</i>	229	Transcriptional regulatory protein belonging to the family of two component regulators. ³²⁻³⁴⁾
<i>nisK</i>	447	Regulatory protein belonging to the same family of two component regulators as NisR. NisK shows similarity to the histidine kinases of two component regulatory systems. ³³⁾
<i>nisF</i>	225	NisF and NisE show strong homology to members of the family of the ATP-binding cassette (ABC) transporter. ³⁵⁾
<i>nisE</i>	247	
<i>nisG</i>	214	NisF, NisE and NisG are involved in immunity to nisin. ³⁵⁾

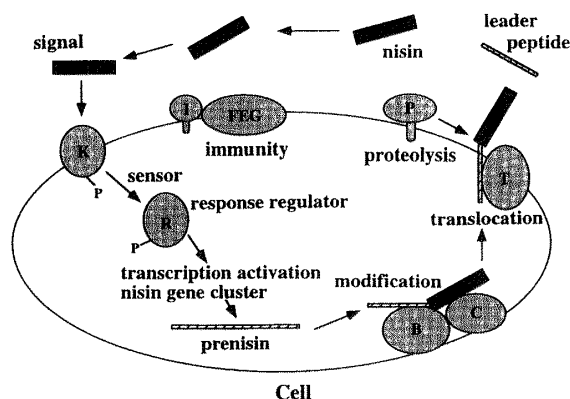


Fig. 3. Model for nisin biosynthesis and regulation.³⁶⁾

および細胞膜の脱分極を引き起こす。⁴⁸⁻⁵³⁾ グラム陰性菌では、エンベロープ (envelope) の外膜がナイシンの細胞膜への進入を防いでおり、結果としてナイシン耐性を示す。しかし、生育阻害がまったくないわけではなく、Cutter と Siragusa⁵⁴⁾ は *Escherichia coli* O157:H7 にナイシンを添加すると、ナイシンを添加しない場合と比べて、菌体量や寒天平板上のコロニー数が減少することを示している。さらに、ナイシンを EDTA のようなキレート剤とともにグラム陰性菌に作用させると、外膜のリポ多糖に存在するマグネシウムイオンがキレート化され、外膜の透過性が増すので、⁵⁵⁾ ナイシンが細胞膜に接触しやすくなり、ナイシンに対する感受性を増すことが知られている。⁵⁴⁻⁵⁸⁾

ナイシンの溶解度は pH に大きく依存し、ナイシン A において pH 2.5 で 12%、pH 5.0 では 4% と比較的大きいが、中性およびアルカリ性ではほとんど不溶である。^{59,60)} 安定性も溶解性と関連しており、pH 2.5 のとき 115.6°C でのオートクレーブによる加熱処理にも安定であるが、pH 5.5 では約 40%、pH 6.8 では約 90% 以上が失活し、pH 7 以上では室温でも失活する。⁵⁹⁾ このように、ナイシンは酸性領域でのみ溶解度が高く、安定であるため、その使用の用途は今のところ制限されている。²⁶⁾ ナイシン A の天然の構造類似体であるナイシン Z はナイシン A の His27 が極性の高い Asn27 に置換しているため、ナイシン A よりも中性 pH での溶解度が高く、⁶¹⁾ しかも同等な抗菌スペクトルおよび抗菌活性を示すことから、⁶²⁾ 実用化が期待される。また、タンパク質工学的手法により、さまざまなナイシン Z 改変体が作製され、中性 pH での溶解性および安定性の増強が試みられている。⁶¹⁾ その際、ナイシンの N 末端側の 19 個のアミノ酸、nisin-(1-19) が、抗菌活性に必要な最小構造であるため、⁶³⁾ ナイシ

ンの C 末端側のアミノ酸を極性の高いものに置換する必要がある。このような改変体の安全性が証明されれば、食品保存料のみならず、新たな抗生物質として医療用、薬用などに広く利用されるに違いない。たとえば、staphylococci に対して抗菌活性が高いことから、虫歯予防における歯磨き粉への利用、病院内感染の原因である多薬剤耐性菌 (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) の殺菌剤などが考えられている。

5. ナイシン生産性の向上

このように、ナイシンは食品保存料など多方面への応用が期待されているが、ナイシンの大量生産技術の確立も不可欠である。乳酸菌のいくつかのバクテリオシンにおいて、培養温度^{64,65)} や pH,⁶⁴⁻⁶⁷⁾ 炭素源,^{64,68)} 窒素源,⁶⁹⁾ リン源⁶⁹⁾ の影響、さらには金属塩、⁶⁴⁾ アミノ酸、⁷⁰⁾ 界面活性剤^{64,65)} などの培地への添加効果などが検討され、その生産性の向上が認められている。乳酸菌が生産するナイシンをはじめとしてバクテリオシンの多くは、生産菌の増殖とともに生産され、一般的に最大菌体量のときに最大抗菌活性を示す。^{67,68)} すなわち、生産菌の増殖における最適温度が、バクテリオシン生産における最適温度と考えられてきたが、必ずしもそうではなく、増殖最適温度よりもやや低い温度の方が生産性が高いこともある。⁷¹⁾ また、pH はバクテリオシン生産においてもっとも重要な因子であり、⁶⁴⁻⁶⁷⁾ 最適な pH は一般的に弱酸性である。また、ナイシン生産菌を pH 6.8 で培養を行うと、生産されたナイシンの 80% 以上が菌体表面に付着していたが、pH 6.0 以下では、80% 以上のナイシンが培養液上清中に存在することが見いだされている。^{72,73)} これは、中性 pH では多くのバクテリオシンが疎水性であるため生産菌の菌体表面に吸着しやすく、低 pH ではそれが遊離するためである。⁷⁴⁾

バクテリオシン生産における炭素源や窒素源の影響についての報告例は少ない。通常乳酸菌の培養には MRS 培地などの完全培地が用いられる。これは、乳酸菌の栄養要求性が複雑であるため、合成培地では菌体の生育が不良であるからである。この性質は、バクテリオシンの生産コストを高くする。したがって、より安価な培地での発酵生産が望まれる。ナイシン生産菌では、スクロース発酵能に関する遺伝子がナイシン生合成遺伝子と同じトランスポゾン上に位置しているため、^{75,76)} スクロースは良好かつ安価な炭素源となり得る。また、*Lactococcus lactis* の多くの株は、キシロー

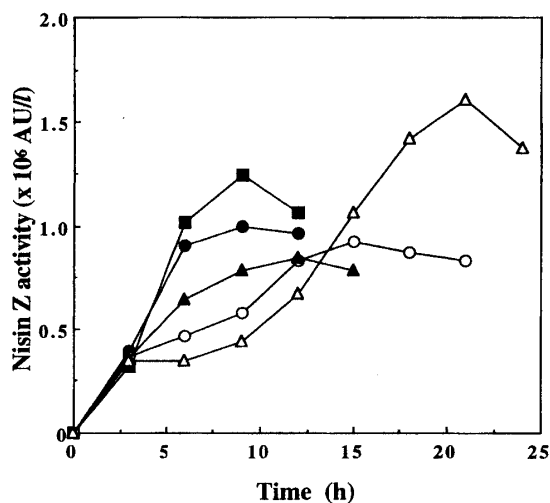


Fig. 4. Influence of the type of carbon source on nisin Z production by *Lactococcus lactis* IO-1. Cultivation was done at 37°C in 300-ml conical flasks containing 100 ml medium with 5 g/l CaCO_3 and 10 g/l carbon source. Symbols: ●, glucose; ○, xylose; ▲, fructose; △, galactose; ■, sucrose.

スを発酵することができないが、*L. lactis* IO-1 は、グルコースと同様にキシロースから著量の L-乳酸を生産し、^{77,78)} さらに、グルコースやスクロースに比べて生産速度が劣るもののナイシン Z を生産する (Fig. 4).⁷⁹⁾ キシロースは農産廃棄物であるヘミセルロースの主成分であり、このような木材資源を有効利用できれば、より安価にナイシン Z が生産されることが期待される。窒素源としては、酵母エキスの他に綿実粕などでナイシンが良好に生産されている。⁶⁹⁾ ナイシン Z 生産において、アミノ酸の培地添加による影響が報告されており、^{70,80)} ナイシンの生合成は硫黄源（システイン、メチオニンなど）の存在に強く依存することが明らかにされている。⁸⁰⁾ 界面活性剤である Tween 80 は、バクテリオシンの生産性を向上させる。^{64,66)} これは、界面活性剤がバクテリオシンの凝集、すなわち抗菌活性の低下を防いでいるものと思われる。

このように、バクテリオシン発酵生産についてさまざまな影響が検討され、その生産性の向上が報告されている。しかしながら、バクテリオシン生産について総合的かつ詳細に研究した例は少ない。筆者らは *L. lactis* IO-1 によるナイシン Z 発酵生産と、菌体増殖や乳酸生産との関連性を検討した結果、カルシウムイオンが菌体の増殖と乳酸生産にはほとんど影響を与えず、ナイシン Z 生産性のみを向上させることを明らかにし、ナイシン Z 生産収率を約 3 倍にまで高めること

に成功した。⁷¹⁾ また、ナイシンは菌体の増殖とともに生産されることから、乳酸と同様に一次代謝産物の特徴を示す。^{67,68)} しかしながら、ナイシン Z 生産における最適条件は乳酸生産における最適条件と異なっていた。これは、ナイシンのプレカーサーペプチド合成や post-translational modification などの生合成過程における最適条件が乳酸生産の場合と異なっていることを示唆するものであった。

さらに、乳酸などの最終生産物の培養系外への除去、回収率の高いバクテリオシン分離法の開発といった培養工学的研究も検討されるべきであり、最近、菌体ろ過モジュールを組み込んだバイオリクターを用いたナイシン連続生産⁸¹⁾ や固定化菌体を用いたナイシン生産⁸²⁾ などが報告されている。

6. バクテリオシン生産菌のスクリーニング

食品保存料として使用されているナイシンの用途は今のところ限られている。したがって、ナイシンよりも好ましい性質を有する天然型バクテリオシンの探索が行われている。バクテリオシン生産菌のスクリーニング法としては、直接法と間接法がある。前者には、Kékessy と Piguet⁸³⁾ の十字法 (cross-streak method)、Gratia⁸⁴⁾ の spot-on-the-lawn assay や Tagg ら⁸⁵⁾ の方法などがある。これらは、分離菌のコロニーに感受性菌（検定菌）を重ねたりする方法であるが、いずれも乳酸菌が生産するさまざまな増殖阻害物質の影響を考慮していない。乳酸や酢酸、プロピオン酸などの有機酸や過酸化水素などは増殖阻害物質であるため、直接法ではバクテリオシン非生産菌でも増殖阻止円を形成することがしばしば起こる。そこで、乳酸菌を分離して培養した後に、サンプルの調製を行う間接法が考えられた。分離源から乳酸菌を分離することは、比較的容易である。炭酸カルシウムを含んだ寒天培地を用いて、乳酸菌をスクリーニングすれば、乳酸菌コロニーの周りの白濁（炭酸カルシウム）が生産される乳酸により溶解してクリアゾーンを形成する。クリアゾーンを形成したコロニーを分離し、培養を行った後、培養液の pH を中性にする、カタラーゼ処理により過酸化水素を分解する、などの処理を行う。このようにして、バクテリオシン以外の増殖阻害物質の影響を除いたサンプルを寒天培地の穿った穴 (well) に添加する Tagg と McGiven⁸⁶⁾ の改良法がしばしば用いられている。⁸⁷⁾ この方法はバクテリオシン自体の抗菌活性の定量にも用いられている。しかしながら、この間接法は操作が

煩雑であるため、簡便なスクリーニング法の開発が望まれている。一つの試みとして、寒天培地を緩衝化して有機酸の影響を抑制できれば、直接法でバクテリオシン生産菌を分離することができるが、検定菌として汎用されている *Micrococcus luteus* のように乳酸に対する感受性が高い場合もあり、必ずしも万能とは言えない。筆者らは、TGC (Thioglycollate medium w/o dextrose, Difco) 寒天培地で、バクテリオシン生産菌の分離が可能であることを見いだした (未発表)。この培地はグルコースなどの糖を含んでいないため、乳酸菌を培養しても乳酸をほとんど生産しない。これにより、バクテリオシンを生産する乳酸菌を簡便に検出することに成功した。

おわりに

ナisinを中心として本論で一部紹介したように、最近の乳酸菌のバクテリオシンに関する研究には、目を見張るものがある。しかしながら、我が国でのこの分野の研究は、欧米に大きく水をあけられている。反面、我が国の伝統的発酵食品などが未知の乳酸菌の魅力的な分離源となりうる可能性を秘めている。たとえば、数百年続いたぬか床がすぐれた乳酸菌の馴養場所として有望である。実際、筆者らは新規なバクテリオシンを生産する乳酸球菌 *Pediococcus* sp. ISK-1 を分離し、バクテリオシンの精製を完了して、⁸⁸⁾ 現在その物質の同定を行っている。この乳酸菌は、欧米などで分離された乳酸菌とは糖の資化性などいくつかの異なった性質を示した。また、ぬか床などでは、安定なマイクロフローラが形成されており、そのフローラコントロール機構と抗菌物質の関係が以前から示唆されていた。最近、バクテリオシン生産を促す誘導物質が感受性菌から単離されており、⁸⁹⁾ さまざまなフローラコントロール機構の解明においても非常に興味深いものである。今後、種々のバクテリオシンについて、上述したような生産菌のスクリーニングやさまざまな生化学的、分子生物学的研究だけでなく、バクテリオシン発酵生産における制御技術の開発、連続生産パイオリアクターの構築、分離・精製システムの開発などの培養工学的研究も進展し、乳酸生産をも含めた Lactate industry world が近い将来開かれていくことを期待したい。

文 献

- 1) Klaenhammer, T. R.: *Biochimie*, **70**, 337-349 (1988).
- 2) Nettles, C. G. and Barefoot, S. F.: *J. Food Prot.*, **56**, 338-356 (1993).
- 3) Klaenhammer, T. R.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 39-86 (1993).
- 4) Ralph, W. J., Tagg, J. R., and Ray, B.: *Microbiol. Rev.*, **59**, 171-200 (1995).
- 5) Gross, E. and Morell, J. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 4634-4635 (1971).
- 6) Piard, J.-C., Muriana, P. M., Desmazeaud, M. J., and Klaenhammer, T. R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 279-284 (1992).
- 7) Mørtevdt, C. I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., and Nes, I. F.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1829-1834 (1991).
- 8) Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H., and Nes, I. F.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1417-1422 (1992).
- 9) Lozano, J. C. N., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Pelaz, C., and Nes, I. F.: *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 1985-1990 (1992).
- 10) Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S.-E., Aukrust, T., and Blom, H.: *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2715-2720 (1992).
- 11) Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F., and Hammes, W. P.: *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**, 460-468 (1992).
- 12) Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C., and Stiles, M. E.: *J. Bacteriol.*, **173**, 7491-7500 (1991).
- 13) Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L. S., Sletten, K., and Nes, I. F.: *J. Bacteriol.*, **174**, 5686-5692 (1992).
- 14) Van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Jeeninga, R. E., Kok, J., and Venema, G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 492-498 (1991).
- 15) Fremaux, C., Ahn, C., and Klaenhammer, T. R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3906-3915 (1993).
- 16) Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A. J., Leenhouts, K. J., Kok, J., Konings, W. N., and Venema, G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1041-1048 (1993).
- 17) Joerger, M. C. and Klaenhammer, T. R.: *J. Bacteriol.*, **167**, 439-446 (1986).
- 18) Vaughan, E. E., Daly, C., and Fitzgerald, G. F.: *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 299-308 (1992).
- 19) Toba, T., Yoshioka, E., and Itoh, T.: *Lett. Appl. Microbiol.*, **12**, 106-108 (1991).
- 20) Toba, T., Yoshioka, E., and Itoh, T.: *Lett. Appl. Microbiol.*, **12**, 43-45 (1991).
- 21) Jimenez-Diaz, R., Rios-Sanchez, R. M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J. L., and Piard, J.-C.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1416-1424 (1993).
- 22) Lewus, C. B., Sun, S., and Montville, T. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 143-149 (1992).
- 23) Upreti, G. C. and Hinsdill, R. D.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7**, 139-145 (1975).

- 24) Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y., and Juven, B. J.: *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 67-77 (1993).
- 25) FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Twelfth report. WHO Technical Report Series, No. 430 (1969).
- 26) Delves-Broughton, J.: *Food Technol.*, **44**, 100-117 (1990).
- 27) Buchman, G. W., Banerjee, S., and Hansen, J. N.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 16260-16266 (1988).
- 28) Kaletta, C. and Entian, K.-D.: *J. Bacteriol.*, **171**, 1597-1601 (1989).
- 29) Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J., and de Vos, W. M.: *Eur. J. Biochem.*, **201**, 581-584 (1991).
- 30) Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammelmann, M., and Entian, K.-D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3730-3743 (1992).
- 31) Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., and de Vos, W. M.: *Eur. J. Biochem.*, **216**, 281-291 (1993).
- 32) Van der Meer, J. R., Polman, J., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., Kuipers, O. P., and de Vos, W. M.: *J. Bacteriol.*, **175**, 2578-2588 (1993).
- 33) Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelmann, M., and Entian, K.-D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 814-825 (1994).
- 34) Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., and de Vos, W. M.: *Eur. J. Biochem.*, **216**, 281-291 (1993).
- 35) Siegers, K. and Entian, K.-D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1082-1089 (1995).
- 36) Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Ruyter, P. G. G. A., Luesink, E. J., and de Vos, W. M.: *J. Biol. Chem.*, **45**, 27299-27304 (1995).
- 37) Mattick, A. T. R. and Hirsh, A.: *Lancet*, **ii**, 5-12 (1947).
- 38) Hirsh, A.: *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 208-221 (1951).
- 39) Berridge, N. J., Newton, G. G. F., and Abraham, E. P.: *Biochem. J.*, **52**, 529-535 (1952).
- 40) Cheeseman, G. C. and Berridge, N. J.: *Biochem. J.*, **65**, 603-608 (1957).
- 41) Cheeseman, G. C. and Berridge, N. J.: *Biochem. J.*, **71**, 185-194 (1959).
- 42) Biley, F. J. and Hurst, A.: *Can. J. Microbiol.*, **17**, 61-67 (1971).
- 43) Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., and Ishizaki, A.: *Food Sci. Technol., Int.*, **2**, 157-162 (1996).
- 44) Allgaier, H., Jung, G., Werner, R. G., Schneider, U., and Zähler, H.: *Eur. J. Biochem.*, **160**, 9-22 (1986).
- 45) Kellner, R., Jung, G., Hörner, T., Zähler, H., Schnell, N., Entian, K.-D., and Götz, F.: *Eur. J. Biochem.*, **177**, 53-59 (1988).
- 46) Kellner, R., Jung, G., Josten, M., Kaletta, C., Entian, K.-D., and Sahl, H. G.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 616-619 (1989).
- 47) Meyer, H. E., Heber, M., Eisermann, B., Korte, H., Metzger, J. W., and Jung, G.: *Anal. Biochem.*, **223**, 185-190 (1994).
- 48) Henning, S., Metz, R., and Hammes, W. P.: *Int. J. Food Microbiol.*, **3**, 121-134 (1986).
- 49) Gao, F. H., Abee, T., and Konings, W. N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2164-2170 (1991).
- 50) Sahl, H.-G.: *Nisin and Novel Lantibiotics*, (Jung, G. and Sahl, H.-G.), p. 347-358, ESCOM Science Publishers B.V., Leiden (1991).
- 51) Benz, R., Jung, G., and Sahl, H.-G.: *Nisin and Novel Lantibiotics*, (Jung, G. and Sahl, H.-G.), p. 359-372, ESCOM Science Publishers B.V., Leiden (1991).
- 52) Abee, T., Gao, F. H., and Konings, W. N.: *Nisin and Novel Lantibiotics*, (Jung, G. and Sahl, H.-G.), p. 373-385, ESCOM Science Publishers B.V., Leiden (1991).
- 53) Okereke, A. and Montville, T. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2463-2467 (1992).
- 54) Cutter, C. N. and Siragusa, G. R.: *J. Food. Prot.*, **58**, 977-983 (1994).
- 55) Stevens, K. A., Klapes, N. A., Sheldon, B. W., and Klaenhammer, T. R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1786-1788 (1992).
- 56) Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A., and Klaenhammer, T. R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3613-3615 (1991).
- 57) Stevens, K. A., Klapes, N. A., Sheldon, B. W., and Klaenhammer, T. R.: *J. Food. Prot.*, **55**, 763-766 (1992).
- 58) Cutter, C. N. and Siragusa, G. R.: *J. Food. Prot.*, **57**, 1028-1030 (1995).
- 59) Hurst, A.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **27**, 85-123 (1981).
- 60) Liu, W. and Hansen, J. N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2551-2558 (1990).
- 61) Rollema, H. S., Kuipers, O. P., Both, P., de Vos, W. M., and Siezen, R. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2873-2878 (1995).
- 62) De Vos, W. M., Mulders, J. W. M., Siezen, R. J., Hugenholtz, J., and Kuipers, O. P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 213-218 (1993).
- 63) Wakamiya, T., Fukase, K., Sano, A., Shimbo, K., Kitazawa, M., Horimoto, S., Fujita, H., Kubo, A., Maeshiro, Y., and Shiba, T.: *Nisin and Novel Lantibiotics*, (Jung, G. and Sahl, H.-G.), p. 189-203, ESCOM Science Publishers B.V., Leiden (1991).
- 64) Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., and Ray, B.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1265-1267 (1991).
- 65) Vaughan, E. E., Daly, C., and Fitzgerald, G. F.: *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 299-308 (1992).
- 66) Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., and Simard,

- R. E.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 166-173 (1993).
- 67) Parente, E., Ricciardi, A., and Addario, G.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 388-394 (1994).
- 68) De Vuyst, L. and Vandamme, E. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 571-578 (1992).
- 69) De Vuyst, L. and Vandamme, E. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 17-22 (1993).
- 70) De Vuyst, L. and Vandamme, E. J.: *Nisin and Novel Lantibiotics*, (Jung, G. and Sahl, H.-G.), p. 397-409, ESCOM Science Publishers B.V., Leiden (1991).
- 71) Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., and Ishizaki, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 36-40 (1996).
- 72) Hurst, A.: *Nature*, **214**, 1232-1234 (1967).
- 73) Hurst, A. and Dring, G. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **50**, 383-390 (1968).
- 74) Yang, R., Johnson, M. C., and Ray, B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 3355-3359 (1992).
- 75) Rauch, P. J. G. and de Vos, W. M.: *J. Bacteriol.*, **174**, 1280-1287 (1992).
- 76) Rauch, P. J. G. and de Vos, W. M.: *Gene*, **121**, 55-61 (1992).
- 77) Ishizaki, A., Ueda, T., Tanaka, K., and Stanbury, P. F.: *Biotechnol. Lett.*, **14**, 599-604 (1992).
- 78) Ishizaki, A., Ueda, T., Tanaka, K., and Stanbury, P. F.: *Biotechnol. Lett.*, **15**, 489-494 (1993).
- 79) Chinachoti, N., 松崎弘美, 園元謙二, 石崎文彬: 日本生物工学会大会要旨集, p. 151 (1996).
- 80) De Vuyst, L.: *J. Appl. Bacteriol.*, **78**, 28-33 (1995).
- 81) Taniguchi, M., Hoshino, K., Urasaki, H., and Fujii, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 704-708 (1994).
- 82) Lante, A., Crapisi, A., Pasini, G., and Scalabrini, P.: *Biotechnol. Lett.*, **16**, 293-298 (1994).
- 83) Kékessy, D. A. and Piguet, J. D.: *Appl. Microbiol.*, **20**, 282-283 (1970).
- 84) Gratia, A.: *C. R. Séances Soc. Biol. Paris*, **140**, 1053-1055 (1946).
- 85) Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W.: *Bacteriol. Rev.*, **40**, 722-756 (1976).
- 86) Tagg, J. R. and McGiven, A. R.: *Appl. Microbiol.*, **21**, 943 (1971).
- 87) De Vuyst, L. and Vandamme, E. J.: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria* (de Vuyst, L. and Vandamme, E. J.), p. 91-142, Blackie Academic & Professional, Glasgow (1994).
- 88) 木村宏和, 松崎弘美, 園元謙二, 石崎文彬: 日本農芸化学会西日本支部大会要旨集, p. 41 (1996).
- 89) Barefoot, S. F., Chen, Y.-U., Hughes, T. A., Bodine, A. B., Shearer, M. Y., and Hughes, M. D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3522-3528 (1994).