

うとするものである。ナイシン系のランチビオティックは、おにぎりをモデルに使用した雑菌増殖のアクセイ系で市販の各種静菌剤に比較しすぐれた効果を示すことが明らかになった。実用化については、ランチビオティック生産菌の培養液を直接使用するのでは、抗菌物質の単位力価が低かったり、培地の栄養成分が雑菌増殖を促進したりするので、簡単な有効成分の濃縮が必要である。これについては、効率の良い吸着溶離が可能なクロマトグラムの開発が進んでいる。また、コストを安く生産す

るには、培地コストの低減が重要である。ホエーに焼酎かすを混合した食品産業廃棄物からの生産を検討している。

- 1) 園元謙二ら：バイオサイエンスとインダストリー，54, 26 (1996).
- 2) 松崎弘美ら：生物工学，75, 125 (1997).
- 3) Matsusaki, H. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 36 (1996).
- 4) Kimura, H. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1049 (1997).

2. 緩慢な生育をする乳酸菌の特性解明への第一歩

岡田 早苗

食品の混濁事故の原因細菌として分離される乳酸菌の中に生育が非常に緩慢なものがある。一般の乳酸菌が24時間以内に最高生育に達するのに対して、緩慢な生育をする乳酸菌は2日以上、場合によっては7日以上もかかるものがある。特に生育に時間がかかる、あるいは平板プレート上でコロニーを形成しにくい乳酸菌が食品に混入していた場合、それらを検出できずに食品が流通することになる。そして流通過程中にそれら乳酸菌が徐々に生育をし、食品混濁やガス発生、パック膨張などといった事故を引き起こすことになる。ビール混濁、滋養強壮剤のガス発生、減塩醤油のプラスチック容器の膨張など稀に起こる際の原因は生育が緩慢な乳酸菌によることが多い。

ビールを混濁させる乳酸菌や生育が緩慢なためにそのすぐれた能力の活用に支障を来しているウィスキー発酵中の有用乳酸菌について、その生育特性について検討をした。生育の段階に従って、誘導期 (lag phase) を短縮することや対数期 (log phase) の増殖速度を上昇させるための条件について検討をし、生育が緩慢である原因の解明を試みることにした。これまでに得られた知見からは、緩慢な生育を十分に説明できる結果や考察は得るに至っていないが、下記のような特徴がわかった。

①対数期の増殖速度については、酵母菌体由来成分を補強することにより、改善を図ることができた。これらの検討の中から酵母菌体由来するナイアシンなどのビタミン結合ペプチド (分子量 1,300 前後) の存在が明らかになった。¹⁾②誘導期短縮に関連して、NADH/NADのリサイクルに注目し、NADH oxidase 活性を検討したところ、緩慢な生育をする乳酸菌にはその活性がないものが見られた。²⁾このことが乳酸菌の生育段階の初期にどのような影響があるのか検討中である。③生育

が特に緩慢であるビール混濁乳酸菌は生育が認められるまで、4日以上を必要とする。それらの分離株について、DNA-DNA hybridizationの実験結果から、*Lactobacillus lindneri* であるとの結論を得ている。³⁾しかし、*L. lindneri* NRIC 0204^T (type strain) は乳酸菌用一般培地であるMRS培地において、48時間以内に full growth に達する生育の速い株である (Fig. 1)。DNA 同士の高いホモロジー値を示している³⁾にもかかわらず、生育の大きな差は何に由来するのか、解決の手段に使えらと考えている。④混濁事故を起こしたビールから分離直後の乳酸菌をビールなどの液体培地で継代培養する場合、培養液量が少量 (5 ml~10 ml) では生育がまったく見られないが、100 ml 以上の培地液量にすると生育が見られる。これは乳酸菌が強い嫌気を要求しているわけではないこともわかっている。さらにこのような乳酸菌を実験室で長く継代培養を繰り返していると、生育がやや良好になる傾向がある。生育が良好になるといっても、24時間や48時

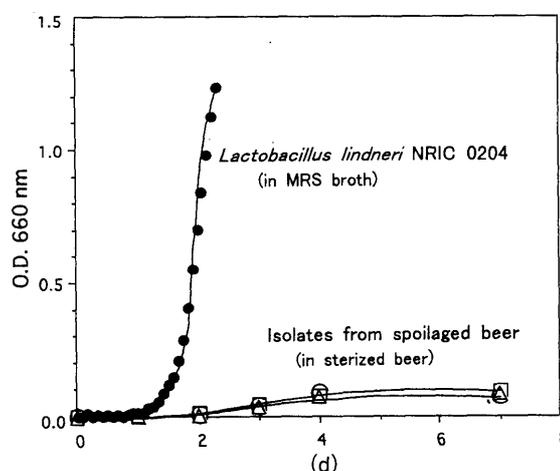


Fig. 1. Growth curves of *Lactobacillus lindneri* NRIC 0204^T and lactic acid bacteria isolated from spoiled draft beer.

間のうちに十分に生育するようになるわけではない。

生育の緩慢な乳酸菌については、以上述べてきたような特性が明らかにされつつあるが、生育の緩慢さが何に由来しているのか結論を得るには至っていない。緩慢な生育をする乳酸菌が上述したように複数の場所で認められている。したがって、生育の緩慢な乳酸菌は、もっと幅広く自然界に分布していることも十分に考えられる。従来の乳酸菌分離法では活性の高い乳酸菌の生育が優先

してしまい、生育の緩慢な乳酸菌が存在していても検出されず、見逃している可能性も推定している。現在、緩慢な乳酸菌の分布を把握する試みも実施している。

- 1) 岡田早苗, 内村 泰: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 21 (1995).
- 2) Sakamoto, M. and Komagata, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 210 (1996).
- 3) 岡田早苗ら: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 21 (1995).

3. 乳酸菌の ATPase 欠損変異株の解析: 酸性条件における ATPase 遺伝子の発現調節

天知 誠吾*・石川 浩平・横田 篤・富田 房男

我々はこれまでに乳酸菌における ATPase の機能解析、および酸性感受性乳酸菌株の構築を目的として *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 株の膜結合型 ATPase 活性低下変異株 No. 1016-51 株を取得し、その特徴を親株と比較してきた。その結果、変異株は酸性条件において細胞内 pH が低下するため親株に比べて酸性感受性を示すこと、さらに両株は酸性条件下で ATPase 活性を上昇させることを明らかにした。¹⁻³⁾ 今回、本変異株の変異のレベルをさらに詳細に解析するため、中性および酸性条件における両株の ATPase 遺伝子の mRNA 量、 β サブユニットのタンパク量を比較した。

1. *Lactococcus* の ATPase 遺伝子に特異的なプローブの構築

広い生物種において高い保存性を示すことが知られている ATPase オペロンの β サブユニット塩基配列をもとにプライマーを設計し、親株のゲノム DNA に対して PCR を行った。増幅された約 0.5 kbp の DNA 断片の全塩基配列を決定し、そのアミノ酸配列を近縁のグラム陽性細菌の ATPase β サブユニットと比較した。その結果、いずれも 80% 以上の高い相同性を示したため、これを *Lactococcus* の ATPase 遺伝子に特異的なプローブとしてノーザン解析に用いることとした。⁴⁾

2. ノーザン解析

酸性、中性条件下で培養した親株および変異株の菌体から総 RNA を抽出し、ノーザン解析に用いた。その結果、Fig. 1 に示すように両株の ATPase 遺伝子の mRNA 量は酸性条件下で顕著に上昇していた。⁴⁾ いくつかの乳酸菌において培地 pH または細胞内 pH の低下に伴い ATPase 活性が上昇することが知られているが、⁵⁻⁹⁾ この現象が転写レベルで制御されていることを示唆したのは

今回が初めてである。また興味深いことに、中性条件における両株の mRNA 量には差が認められなかったのに対し、酸性条件下では親株よりも変異株において mRNA 量が増大していることが明らかとなった。*Enterococcus hirae* においては ATPase 活性が細胞内 pH によって制御されることが報告されている。^{5,6)} 酸性条件下での培養では親株よりも変異株においてより細胞内 pH が低いと推察されることから、*Lactococcus* においても細胞内 pH によって ATPase の発現が制御されているとすれば、変異株においてより mRNA 量が上昇すると考えられる。

3. ウェスタン解析

抗体には *E. hirae* の ATPase F_1 部位⁵⁾ および Thermo-

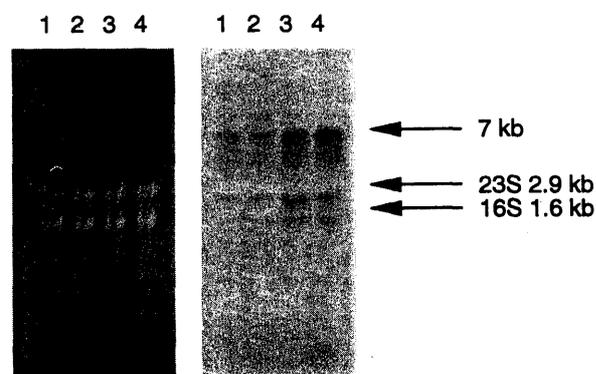


Fig. 1. Northern blot analysis of RNA extracted from the cells cultured in pH-controlled jar fermentors. The parental strain (lanes 1, 3) and the strain No. 1016-51 (lanes 2, 4) were cultured with pH controlled at 7.0 (lanes 1, 2) and 4.5 (lanes 3, 4). Total RNA was extracted from the cells of these strains. The extracted RNA samples were fractionated on agarose-formaldehyde gel, blotted to nylon membrane, and hybridized with [α -³²P]dCTP-labelled 0.5-kb PCR fragment containing part of ATPase $F_1\beta$ subunit gene of *L. lactis*. The 16S and the 23S rRNA bands were used as size standards.

* 連絡先、現在：通産省工業技術院 生命工学工業技術研究所 複合微生物研究室

〒305-8566 つくば市東1-1 TEL. 0298-54-6593 FAX. 0298-54-6587 E-mail: amachi@nibh.go.jp (Seigo Amachi)