

1Cp11 *Enterococcus faecalis* NP10011 株に感染するバクテリオファージの解析

○堀内 智博¹, 林 篤志², 嶋田 貴志², 栗冠 真紀子¹, 木村 哲哉¹, 栗冠 和郎¹

(¹三重大院・生資, ²ニチニチ製薬・中研)

我々はこれまでに乳酸菌 *Enterococcus faecalis* NP10011 株に感染する新規のバクテリオファージについて、その増殖特性について報告してきた。今回は新たに判明したファージの性質について報告する。

ファージ核酸を抽出し ExonucleaseIII 処理、及び制限酵素処理した結果、ファージの核酸は二本鎖 DNA であることが判明した。本ファージの DNA 全長は、アガロースゲル電気泳動により、約 50kbp であることが確認された。クローンライブラリーをつくり、塩基配列の解析を行った結果、一部の塩基配列が *Enterococcus* phage F4 minor capsid protein gene に 86% の相同性を示したが、全体的に他のファージとは相同性が極めて低く新規のファージであることが示された。*E. faecalis* の感染株と非感染株を用いて、ファージの感染についての検討を行った結果、非感染株ではファージが細菌表面へ吸着のされないことが確認された。また、SDS-PAGE の結果、このファージは 8 種のタンパク質から構成されることが示された。現在、それらのタンパク質の N 末端解析を進めており、ゲノム解析の結果とあわせて報告する予定である。

Analysis of a Bacteriophage infective to *Enterococcus faecalis* NP10011

○Tomohiro HORIUCHI¹, Atsushi HAYASHI², Takashi SHIMADA², Makiko SAKKA¹, Tetsuya KIMURA¹, Kazuo SAKKA¹

(¹Grad. Sch. Bioresources, Mie Univ., ²Nichi Nichi Pharm. Co.)

Key words bacteriophage, *Enterococcus faecalis*, adsorption, capsid protein

1Cp13 沖縄微生物ライブラリーのバクテリオシン生産性を指標とした特性評価

○豊里 哲也¹, 池端 真美¹, 安座間 盛力¹, 高良 亮¹, 渡嘉敷 唯章¹, 波平 知之², 新里 尚也², 松井 徹²

(¹トロピカルテクノセンター, ²琉大・熱生研)

【背景・目的】沖縄県は、日本国内で唯一の亜熱帯に属する地域で、さらに周りを海に囲まれるなど、特殊環境下にある。そのため他府県には見られない特徴のある微生物など、亜熱帯生物資源の宝庫である。現在、有用物質生産性などの機能性を有する微生物を収集し評価や菌の同定を行うことを目的とした沖縄微生物ライブラリーの構築を行っている。これまでに乳酸菌、酵母および放線菌など多数分離しており、分離した菌株の特性評価を行ってきた。そのなかで、グラム陽性細菌に対し抗菌活性を有する乳酸菌が多数分離された。今回、抗菌活性を有する菌株とその菌株が生産する抗菌物質に関して報告する。

【実験方法・結果】沖縄本島および離島を含む県内より 515 試料を収集した。その試料から 1%CaCO₃ を含む MRS 培地を用いて生酸菌の分離を試みたところ、約 5,000 菌株の生酸菌を得た。グラム陽性および陰性細菌を用いた抗菌試験において、グラム陽性細菌である *S.aureus*、*M.luteus*、*B.subtilis* などに抗菌活性を有する菌株が約 500 株得られた。抗菌活性の高い菌株に関して、16srDNA に対する遺伝子解析を行ったところ、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* と高い相同性を持つことが明らかとなった。同様にナisin 特異的プライマーを用いた遺伝子解析において、それらの株からナisin Z と相同性の高い配列が得られた。

Characteristic evaluation of Okinawa microbial library based on the bacteriocin productivity.

○TETSUYA TOYOSATO¹, IKEHATA MAMI¹, AZAMA MORICHIKA¹, TAKARA RYO¹, TOKASHIKI TADAAKI¹, NAMIHIRA TOMOYUKI², SHINZATO NAOYA², MATSUI TORU²

(¹Tropical Technology Center. LTD, ²TBRC, Univ. Ryukyus)

Key words lactic acid bacteria, bacteriocin, Okinawa microbial library

1Cp12 海水天日塩から分離した好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分類学的性状

○石川 森夫, 岡本 (貝沼) 章子, 二井 大作, 山里 一英, 小泉 幸道

(東農大・応生科・醸造)

【目的】乳酸菌の多くは中性～微酸性、食塩非含有条件を至適域とする。しかし、近年、海洋生物試料や熟成チーズにおいて好塩性・好アルカリ性の乳酸菌群の存在が報告されている。そこで、本研究では好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離源、分類群の多様性を明らかにすることを目的とし、各種海水天日塩及び岩塩から好塩性・好アルカリ性乳酸菌を分離し、その系統・分類学的性質を調べた。

【実験方法及び結果】海水天日塩及び岩塩、計 31 点を食塩濃度 1～7% (w/v) となるよう pH 8～9 のグルコース、ペプトン、魚肉エキスを含む培地に添加、集積培養を行い、9 点の海水天日塩よりグラム陽性の酸生成菌 71 株を分離した。うち、21 株について 16S rRNA 遺伝子の系統解析を行った結果、分離株は 2 つの系統的グループを構成した。一方は海洋環境、熟成チーズから分離報告のある好塩性・好アルカリ性乳酸菌 *Alkalibacterium* 属内でクラスターを形成、他方は *Bacillus* 科の中で好・耐塩性/好・耐アルカリ性の属が集まる系統的広がりの中、呼吸鎖をもつ *Paralibacillus* 属、および呼吸鎖をもたない *Amphibacillus* 属、*Halolactibacillus* 属の近傍でクラスターを形成した。分離株は全て好・耐塩性 (至適: 2.5-5%)、好・耐アルカリ性 (至適 pH: 9.0) を示し、天日塩に好塩性・好アルカリ性乳酸菌が存在することを明らかにした。本研究は (財) 発酵研究所研究助成を受け実施したものである。

Characterization of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria isolated from sea-salt

○Morio ISHIKAWA, Akiko OKAMOTO (KAINUMA), Daisaku FUTATSUI, Kazuhide YAMASATO, Yukimichi KOIZUMI

(Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words halophile, alkaliphile, lactic acid bacteria, sea-salt

1Cp14 *Bacillus* 属細菌のケイ素含有レイヤー構造体の形成と生理機能の解析

○畑 夢博, 松山 論史, 池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫

(広島大院・先端・生命機能)

【目的】ケイ素は酸素について地殻中に最も多く存在する元素であり、生物にとって重要な役割を担っている。植物やケイ藻は、ケイ酸 (H₄SiO₄) を取り込み、体内でバイオシリカを形成することで組織の強度を高めている。土壌微生物では、数種の微生物がケイ酸を蓄積することが過去に報告されているが、その蓄積機構や生理的役割は不明であった。当研究室では、多量のケイ酸を蓄積する *Bacillus cereus* に近縁の細菌を土壌中から取得した。そこで、単離した細菌のケイ酸蓄積機構と生理的役割の解析を目的とした。

【方法・結果】経時的にケイ酸濃度測定と菌体顕微鏡観察を行ったところ、孢子形成時にケイ酸の蓄積が見られた。孢子内のケイ素の局在を調べるため、超薄切片を作製し透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、ケイ素を蓄積した孢子において、outer coat (OC) レイヤーの肥大化及びその外側にナノメートルサイズの粒子状構造物からなる新規レイヤー構造の出現が見られた。EDX 元素解析の結果、両者はケイ素を含んでいた。現在、ケイ素含有レイヤー構造体の役割解明や形成メカニズムの解析を行っている。

Analysis of the physiological role of the silicon layer in *Bacillus*

○Yumehiro HATA, Satoshi MATSUYAMA, Takeshi IKEDA, Ryuichi HIROTA, Akio KURODA

(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words Silicate, Spore, Silicon layer