

Lactobacillus plantarum における メリビオース代謝の高温感受性機構の解析

岡山大学医学部細菌学教室 (指導: 金政泰弘教授)

田 村 千 幸

(平成3年3月13日受稿)

Key words: *Lactobacillus plantarum*, メリビオース, 高温感受性,
 α -ガラクトシダーゼ, メリビオース輸送系

緒 言

Lactobacillus plantarum は、漬物や発酵ソーセージなど発酵食品の製造に利用されるとともに¹⁾、家畜の冬季粗飼料であるサイレージの調製時には、活発な乳酸発酵を行なってサイロ内のpHを低下させ、有害な *Clostridium* 属菌の増殖を抑制して良質なサイレージの調製に寄与している²⁾。*L. plantarum* は、自然界では植物から高率に分離されており³⁾、著者はその糖発酵性を検定する過程で、植物中に豊富に含まれているメリビオースおよびラフィノースの代謝が高温感受性であることを見出した。即ち、本菌は30℃ではこれらの糖質を利用してよく増殖するが、37℃ではまったく増殖が認められない。このような現象は、大腸菌 *Escherichia coli* K-12系統のメリビオース代謝系でも Beckwith によって報告されているが⁴⁾、*Lactobacillus* 属菌では本報告が初めてである。

E. coli のメリビオース代謝系は、メリビオースの透過にあずかるガラクトシドパーミアーゼ系とメリビオース分解酵素である α -ガラクトシダーゼにより構成される⁵⁾。Prestidge と Pardee は、*E. coli* にはラクトースオペロンの *lacY* 遺伝子にコードされているラクトース輸送を司どるチオメチルガラクトシドパーミアーゼ I (以下 TMG パーミアーゼ I と略) の他に、別のガラクトシドパーミアーゼが存在することを発見し、これをチオメチルガラクトシドパーミアーゼ II (以下 TMG パーミアーゼ II と略) と命名

した⁶⁾。彼等はさらに、*E. coli* K-12系統の TMG パーミアーゼ II が37℃で不活化されることを明らかにし、TMG パーミアーゼ I を欠く K-12系統は、菌体内にメリビオースを取込むことができないために37℃で増殖できないと述べている⁶⁾。

著者は、予備実験として *L. plantarum* の菌体および培養液より α -ガラクトシダーゼ活性の検出を試みたところ、菌体には α -ガラクトシダーゼ活性が存在するにもかかわらず、培養液中には本酵素の活性はまったく検出されなかった。従って、本菌においてもメリビオースはその輸送系によって細胞内に取込まれた後、 α -ガラクトシダーゼによって分解されると考えられる。

本実験では、*L. plantarum* が37℃でメリビオースを利用して増殖しない現象は、メリビオース輸送系あるいは分解酵素 α -ガラクトシダーゼのいずれが高温感受性であることに由来するものであるか検討し、その結果、メリビオース輸送系が高温で誘導されないことが明らかになった。

材 料 と 方 法

1. 供試菌および培地組成

本実験には *L. plantarum* ATCC 8014を供試した。本菌を、1%グルコース添加 ISL 液体培地にて37℃で一夜静置培養し、この前培養液を1000容の新鮮培地に接種した。ISL 培地11中の組成は、Trypticase peptone 10g, Yeast extract 5g, Tryptose 3g, K₂HPO₄ 3g, KH₂

PO₄ 3g, (NH₄)₃C₆H₅O₇ 2g, CH₃COONa 1g, Tween 80 1g, MgSO₄·7H₂O 0.575g, FeSO₄·7H₂O 0.034g, MnSO₄·2H₂O 0.12gであり、さらに、Mini-sart NML 0.2μm (ザルトリウス社) でフィルター滅菌した糖質を最終濃度1%になるよう添加した。なお、培地 pH は 6.8 に調整した。

2. 糖発酵性の検定

前培養した菌を、各種糖質1%および pH 指示薬として0.008%のプロムクレゾールブルー(以下 BCP と略) を含む ISL 培地に接種し、30℃ および37℃ で24時間、48時間および72時間培養して、両温度における糖発酵性を調べた。対照として、糖質を添加しない BCP 添加 ISL 培地に菌を接種し、同様に培養した。糖質が分解されて生じた酸により BCP が黄変した場合、糖発酵性を陽性とした。供試した糖質は、アラビノース、キシロース、ガラクトース、グルコース、マンノース、フルクトース、ラムノース、マルトース、セロビオース、トレハロース、メリビオース、ラクトース、スクロース、ラフィノース、メレジトース、ソルビトール、マンニトールおよびサリシンの18種類であった。

3. 菌の増殖測定

前培養した菌を、メリビオース、ラクトース、ラフィノースを各々添加した ISL 培地および対照として糖質を添加しない ISL 培地に接種し、菌の増殖を経時的に観察した。菌量は U-2000 分光光度計 (日立製作所) を使用して光電比色法により測定し、波長650nm における濁度で表した。

4. α-ガラクトシダーゼおよび β-ガラクトシダーゼ活性の測定

α-ガラクトシダーゼおよび β-ガラクトシダーゼの測定には、完全菌体を用いた。本菌を、メリビオースあるいはラクトースを添加した ISL 培地にて30℃ および37℃ で約20時間培養し、4℃ で5000r.p.m., 10分間の遠心分離により集菌し、20mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で洗浄後、同一緩衝液に 2 mg 湿菌量/ml となるよう懸濁した。この細胞懸濁液 1 ml を、2 mM の o-ニトロフェニル-α-D-ガラクトピラノシド(以下 α-ONPG と略) あるいは o-ニトロフェニル-

β-D-ガラクトピラノシド(以下 β-ONPG と略) を含む等量の20mM リン酸ナトリウム緩衝液と混和し、30℃ および37℃ でインキュベートした。30分後、2 ml の 0.5MN₂CO₃ を添加して反応を停止させ、Mini-sart NML 0.45μm (ザルトリウス社) で除菌後、o-ニトロフェノールの吸光度を波長420nm で測定して、湿菌量 1 mg の菌が単位時間当たり遊離する o-ニトロフェノール量を求めた。

5. [³H]-メリビオースの調製

[³H]-メリビオースは、Tanaka らの方法⁷⁾ を改変し [³H]-ラフィノースをインペルターゼにより加水分解して調製した。 [³H]-ラフィノースは Du Pont NEN Research Products より購入した。0.3ml の 0.5mM [³H]-ラフィノース水溶液を、等量の0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.9) に溶解したインペルターゼ100μg/ml と混和し、50℃ で90分間インキュベートした。0.6ml の 0.5M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を添加した後、沸騰水中で3分間加熱してインペルターゼを不活化し、ただちに氷冷した。次に、この [³H]-ラフィノース加水分解産物1.2 ml を蒸留水で平衡化したセファデックス G-15カラム (1.6cm×90cm) に添加し、室温にて流速20 ml/時間で溶出して 2 ml ずつ分取した。各画分の放射活性を測定し、 [³H]-メリビオースに相当する画分を回収して、非ラベルメリビオース溶液で希釈して供試した。

ラフィノース、メリビオースおよびフルクトースの溶出パターンは、予め非ラベルラフィノースのインペルターゼ分解産物を用いて決定した。ゲル濾過クロマトグラフィー後の各画分を凍結乾燥により濃縮し、ラフィノース、メリビオースおよびフルクトース標品とともに Toyo No. 51B 濾紙 (東洋濾紙会社) にスポットして、n-ブタノール-酢酸-水 (26 : 6 : 25) で18時間展開後、風乾した。糖質の検出は、ジフェニルアミン-アニリン試薬⁸⁾ を噴霧した後、80℃ で5分間発色させた。

6. メリビオース輸送系活性の測定

メリビオース輸送系の活性は、Winkler らの方法⁹⁾ に準じて測定した。本菌を、メリビオースあるいはラクトースを添加した ISL 培地にて30℃

あるいは37℃で約20時間培養し、4℃で5000 r.p.m., 10分間の遠心分離により集菌し、50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で洗浄後、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含む糖質無添加 ISL 培地に、1.5mg湿菌量/mlになるよう懸濁した。30℃あるいは37℃で5分間プレインキュベートした後、最終濃度100 μM の [^3H] -メリビオースを添加して、各温度で30秒、1分、2分、4分および6分間インキュベートした。この反応液100 μl を、直径25mm, 孔径0.65 μm の MF-ミリポアフィルター (日本ミリポア・リミテッド) で減圧吸引濾過し、フィルター上の菌体を1mlのリン酸カリウム緩衝液で洗浄した後、その放射活性をシンチレーター、クリアゾルI (ナカライテック株式会社) 2ml中でシンチレーションカウンターを使用して測定した。

結 果

1. メリビオースおよびラフィノース代謝の高温感受性

L. plantarum の30℃および37℃における糖発酵性は、Table 1に示した。糖質を添加しないBCP添加培地で本菌を培養した場合、いずれの温度でもBCPは黄変しなかった。供試した18種類の糖質のうち、二糖類のメリビオースおよび三糖類のラフィノースの代謝は顕著な高温感受性を示した。メリビオースあるいはラフィノースを添加した培地で30℃で菌を培養した場合、接種24時間後にBCPは紫色から淡緑色に変化し、48時間後には完全に黄変したが、37℃では接種72時間後でもBCPの黄変は観察されなかった。また、これらの糖質を構成する単糖であるガラクトース、グルコースあるいはフルクトースを添加した培地で培養した場合、本菌はいずれの温度においても速やかに増殖し、接種24時間後にはBCPが黄変した。

次に、菌の増殖を経時的に観察した。Fig. 1は、糖質を添加しない培地における菌の増殖であり、*L. plantarum* は添加した糖質以外の培地成分を利用してわずかに増殖した。メリビオースを糖質として添加した培地では、Fig. 2に示したように、本菌は30℃および37℃いずれの温度でも接種10時間目までわずかに増殖し、その

後30℃では接種16時間目より再び増殖を開始し、菌量は急速に増加して26時間目には定常期に達したが、37℃ではその後はまったく増殖が認められなかった。同様な現象はラフィノース添加培地でも観察され、Fig. 3に示したように本菌はラフィノース以外の培地成分を利用してわずかに増殖した後、30℃では接種28時間目より増殖を再開したが37℃では増殖しなかった。また、ラクトースを添加した培地で本菌を培養した場合には、Fig. 4の如く30℃よりむしろ37℃でよく増殖し高温感受性は認められなかった。

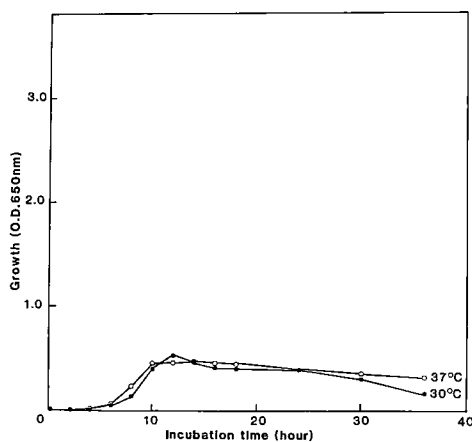


Fig. 1 Growth of *L. plantarum* in ISL medium not supplemented with carbohydrate.

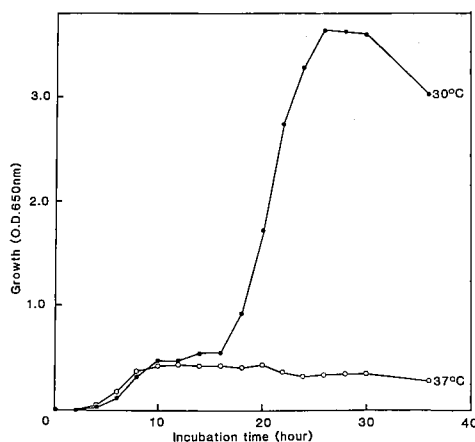


Fig. 2 Growth of *L. plantarum* in ISL medium supplemented with 1% melibiose.

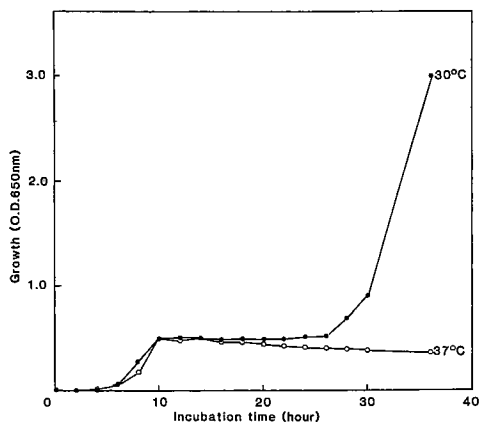


Fig. 3 Growth of *L. plantarum* in ISL medium supplemented with 1% raffinose.

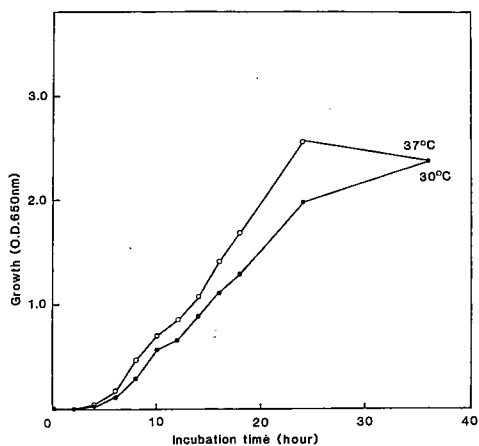


Fig. 4 Growth of *L. plantarum* in ISL medium supplemented with 1% lactose.

2. α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼの活性と反応温度

L. plantarum を、メリビオースあるいはラクトースを添加した培地にて30°Cで培養し、その完全菌体と α -ONPG を30°Cおよび37°Cで反応させ、両温度における α -ガラクトシダーゼ活性を比較した。Fig. 5に示したように、 α -ガラクトシダーゼはいずれの温度でも α -ONPG を分解したが、30°Cで反応させた場合にはより高い活性が認められ、30°Cにおける活性は37°Cにおける活性の約1.5倍であった。次に、本菌を同様の条件で培養し、その完全菌体を基質 β -ONPG

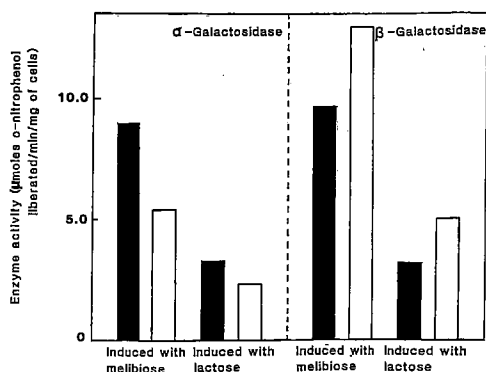


Fig. 5 Effect of assay temperature on activity of α -galactosidase and β -galactosidase.

■ : assayed at 30°C
□ : assayed at 37°C

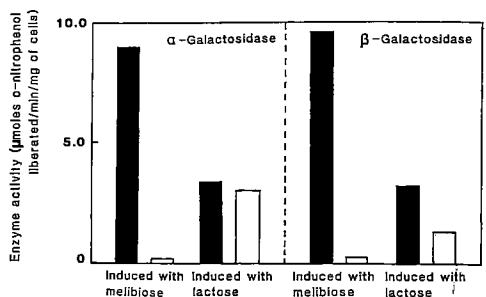


Fig. 6 Effect of incubation temperature on induction of α -galactosidase and β -galactosidase.

■ : incubated at 30°C
□ : incubated at 37°C

と30°Cおよび37°Cで反応させたところ、 β -ガラクトシダーゼは30°Cより37°Cで活性がやや高く、30°Cにおける活性は37°Cにおける活性の約4/5であった。

3. α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼの誘導と培養温度

本菌を、メリビオースあるいはラクトースを添加した培地にて30°Cおよび37°Cで培養し、その α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼ活性を30°Cで測定して、両酵素の誘導に及ぼす培養温度の影響を調べた。Fig. 6に示したように、メリビオース添加培地で培養した場合、30°Cでは極めて高い α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼ活性が認められたが、37°C

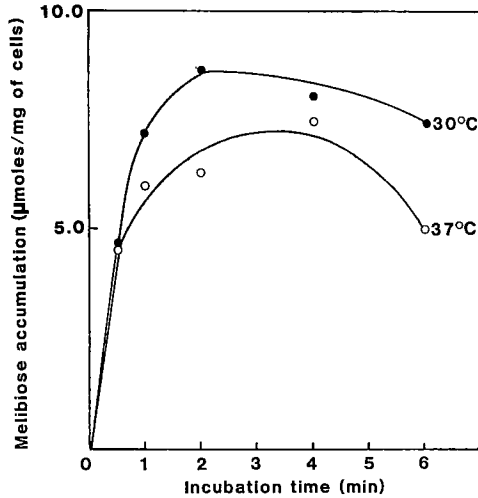


Fig. 7 Effect of assay temperature on activity of melibiose transport system.

では両酵素ともわずかな活性しか検出されなかった。また、ラクトース添加培地では30°Cあるいは37°Cいずれの温度で培養しても、両酵素がともに誘導された。

4. メリビオース輸送系の活性と反応温度

メリビオース輸送系の活性に及ぼす反応温度の影響を調べる目的で、本菌をメリビオースを添加した培地にて予め30°Cで培養した後、菌体内への ^3H -メリビオースの取り込みを、30°Cおよび37°Cで測定した。両温度におけるメリビオース輸送系の活性を比較したところ、Fig. 7に示すように、本菌はいずれの温度においても速やかに ^3H -メリビオースを取り込み、反応を開始して2分後には菌体内の ^3H -メリビオース量は最大となり、以後徐々に減少した。 ^3H -メリビオースの取り込み速度は37°Cよりも30°Cでやや大きかったが、顕著な差は認められなかった。

5. メリビオース輸送系の誘導と培養温度

メリビオース輸送系の誘導に及ぼす培養温度の影響を調べる目的で、本菌を、メリビオースあるいはラクトースを添加した培地にて30°Cおよび37°Cで培養して、菌体内への ^3H -メリビオースの取り込みを30°Cで測定した。その結果をFig. 8に示す。メリビオース添加培地にて30°Cで培養した場合、本菌は速やかに ^3H -メリビ

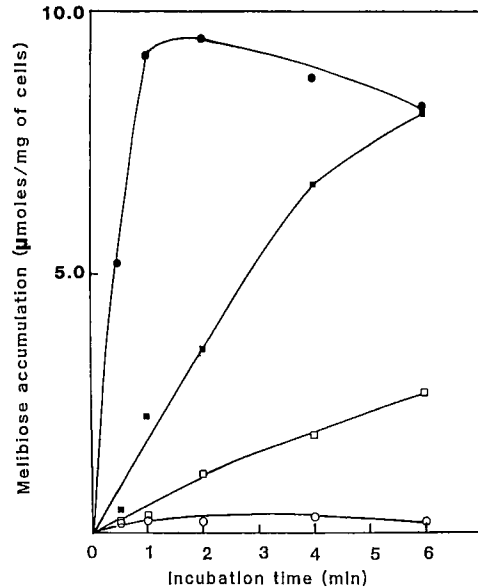


Fig. 8 Effect of incubation temperature on induction of melibiose transport system.

●—● : incubated in ISL medium supplemented with melibiose at 30°C
○—○ : incubated in ISL medium supplemented with melibiose at 37°C
■—■ : incubated in ISL medium supplemented with lactose at 30°C
□—□ : incubated in ISL medium supplemented with lactose at 37°C

オースを取り込み、反応を開始して2分から4分後に菌体内の ^3H -メリビオース量は最大値を示したが、37°Cで培養した場合には、菌体内への ^3H -メリビオースの取り込みはまったく認められなかった。一方、ラクトース添加培地で培養すると、30°Cあるいは37°Cいずれの温度で培養しても、菌体は ^3H -メリビオースを速やかに取込んだ。このとき、30°Cで培養した菌は、37°Cで培養した菌の約3倍の速度で ^3H -メリビオースを取り込んだ。

6. メリビオース輸送系の30°Cおよび37°Cにおける安定性

本菌を、メリビオース添加培地にて30°Cで約20時間培養し、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で洗浄後、50μg/mlのクロラムフェニコールを含む糖質無添加ISL培地に、1.5mg湿菌量/mlになるよう再懸濁した。この菌懸濁液の一部

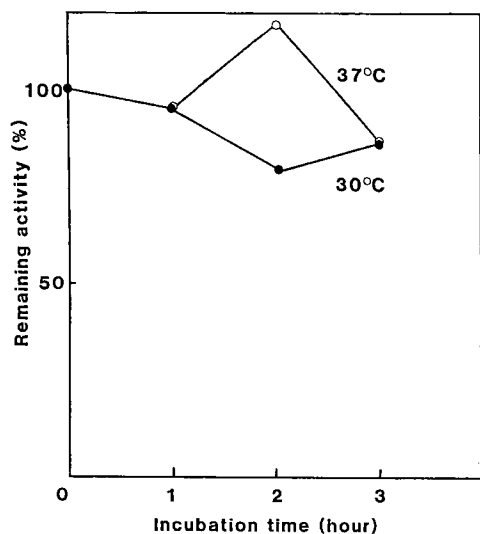


Fig. 9 Stability of melibiose transport system at 30°C and 37°C.

をとり、ただちに30°Cで5分間プレインキュベートした後、最終濃度100 μ Mの ^3H -メリビオースを添加し、4分後に菌体内に取込まれた ^3H -メリビオースを定量して対照とした。次に、残りの懸濁液を2つに分けて各々を30°Cあるいは37°Cの恒温槽中に静置して加温処理を行ない、1時間、2時間および3時間後にその一部を氷冷してインキュベーションを停止した。これら各温度でインキュベートした菌体が4分間に取込む ^3H -メリビオース量を、対照の場合と同様に測定し、対照に対する百分率で表した。Fig. 9に示したように、30°Cおよび37°Cいずれの温度で処理しても、3時間後の活性は対照の86%から87%であり、温度処理によるメリビオース輸送系活性の低下は観察されなかった。

考 察

L. plantarum の18種類の糖質に対する発酵性を、30°Cおよび37°Cで検定したところ、Table 1に示したように、メリビオースおよびラフィノースの代謝は顕著な高温感受性を示した。同様な現象は、既に *E. coli* K-12系統のメリビオース代謝系で観察されている⁴⁾。

E. coli をメリビオースを含む培地に接種すると、メリビオース輸送系である TMG パーミア

Table 1 Fermentation profiles of *L. plantarum* at 30°C and 37°C. Symbols indicated the color of BCP.

- : purple, \pm : light green, + : light yellow, ++ : dark yellow

Carbohydrate	Temperature (°C)	Fermentation (change in the pH indicator, BCP)		
		24hr	48hr	72hr
None	30	-	-	-
	37	-	-	-
Arabinose	30	+	+	+
	37	+	+	+
Xylose	30	-	-	-
	37	-	-	-
Galactose	30	#		
	37	#		
Glucose	30	#		
	37	#		
Mannose	30	#		
	37	#		
Fructose	30	#		
	37	#		
Rhamnose	30	-	\pm	\pm
	37	-	\pm	\pm
Maltose	30	#		
	37	#		
Cellobiose	30	#		
	37	#		
Trehalose	30	#		
	37	#		
Melibiose	30	\pm	#	
	37	-	-	-
Lactose	30	+	#	
	37	+	#	
Sucrose	30	#		
	37	#		
Raffinose	30	\pm	#	
	37	-	-	-
Melezitose	30	#		
	37	#		
Sorbitol	30	\pm	#	
	37	-	#	
Mannitol	30	#		
	37	#		
Salicin	30	#		
	37	#		

ーゼIIとメリビオース分解酵素 α -ガラクトシダーゼが誘導されるか⁵⁾、K-12系統のTMGパーミアーゼIIは熱に対して不安定であるために⁶⁾、TMGパーミアーゼI即ちラクトース輸送系を欠くK-12系統は、メリビオースを菌体内に取込むことができず、37°Cでは増殖しない。一方、メリビオースは、TMGパーミアーゼIIのみな

らず TMG パーミアゼ I を誘導し^{10,11,12}、誘導された TMG パーミアゼ I は、ラクトースの他にメリビオースをも輸送するので^{7,10}、TMG パーミアゼ I が健全であるならば、37°C ではメリビオースは TMG パーミアゼ I によって菌体内に取込まれ、 α -ガラクトシダーゼの分解を受けて利用される。

予備実験の結果、*L. plantarum* の菌体には α -ガラクトシダーゼ活性が存在するにもかかわらず、その培養液中には本酵素の活性はまったく検出されなかった。従って、本菌のメリビオース代謝系もメリビオース輸送系と α -ガラクトシダーゼにより構成されており、メリビオースはその輸送系によって細胞内に取込まれた後、 α -ガラクトシダーゼによって分解されると考えられる。また、糖質を添加しない培地あるいはグルコース添加培地で培養した菌の α -ガラクトシダーゼ活性は、メリビオース添加培地で培養した場合に比べて極めて低いので、本菌においてもメリビオースによってその代謝系が誘導されることが、予備実験により示唆された。そこで本実験では、*L. plantarum* が37°C ではメリビオースを利用して増殖しない現象は、本菌のメリビオース輸送系および α -ガラクトシダーゼの誘導あるいは機能のいずれが高温感受性であることに由来するものか解析を行なった。

E. coli においては、 α -ガラクトシダーゼは30°C のみならず37°C でも誘導され、37°C で α -ONPG を分解する¹³。そこで、本実験でもまず、*L. plantarum* の α -ガラクトシダーゼ活性に及ぼす反応温度の影響および本酵素の誘導に及ぼす培養温度の影響について検討を行なった。30°C で培養した菌を用いて、反応温度30°C および37°C で α -ガラクトシダーゼ活性を測定した結果、Fig. 5 に示したように、37°C における本酵素の活性が30°C に比べて著しく低いという事実はなかった。従って、*L. plantarum* が37°C でまったくメリビオースを代謝しない現象は、本酵素の至適温度に起因するものではないと考えられる。次に、 α -ガラクトシダーゼの誘導に及ぼす培養温度の影響を調べたところ、Fig. 6 に明らかなように、メリビオースは30°C では α -ガラクトシダーゼを誘導したが、37°C ではほとんど誘導しな

かった。しかしながら、ラクトースはいずれの温度でも α -ガラクトシダーゼを誘導するので、本酵素の誘導機構が高温感受性であるとは結論できない。以上の結果は、本菌のメリビオース代謝系が示す高温感受性は、 α -ガラクトシダーゼよりもむしろメリビオース輸送系に由来することを示唆している。

そこでまず、メリビオース輸送系の活性を30°C および37°C で測定したところ、Fig. 7 に示したように、両温度における活性にはほとんど差がなかった。次に、メリビオース輸送系の誘導に及ぼす培養温度の影響を調べた結果、Fig. 8 に明らかなように、メリビオース添加培地で30°C で培養した菌体は [³H]-メリビオースを取込んだが、37°C で培養した菌体はほとんど [³H]-メリビオースを取込まなかった。37°C で培養した菌体が [³H]-メリビオースを取込まない理由としては、37°C でメリビオース輸送系が誘導されないか、あるいは *E. coli* K-12 系統で報告されているように、輸送系が誘導されても37°C で不活化されることが考えられるので、この点について検討した。*E. coli* K-12 系統の TMG パーミアゼ II が37°C で不活化されることを、初めて報告したのは Prestidge らであるが⁹、Tsuchiya らもまた、30°C で培養した *E. coli* を37°C でインキュベートすると、30分後にはメリビオース輸送系の活性が対照の50%に減少し、3時間後にはほぼ完全に失活すると報告している¹⁴。本実験でも同様にして、30°C あるいは37°C でメリビオース輸送系が不活化されるか否かを調べたところ、Fig. 9 に示したように、*E. coli* で報告されているような顕著な活性の低下は認められなかった。このことは、*L. plantarum* のメリビオース輸送系は37°C で不活化されるのではなく、その誘導機構そのものが高温感受性であることを示唆している。

一方、ラクトース添加培地で培養すると、Fig. 8 に示したように、30°C および37°C いずれの温度で培養した菌体も [³H]-メリビオースを取込んだが、前項で述べたように、メリビオース輸送系は37°C では誘導されないと思われるので、本輸送系によって取込まれたとは考え難い。*E. coli* においては、メリビオースはメリビオース

輸送系のみならずラクトース輸送系によっても取込まれる^{7,10}。従って、*L. plantarum*においても、ラクトース添加培地で培養するとラクトース輸送系が誘導され、メリビオースを取込むものと考えられる。

また、*E. coli*のラクトース輸送系がメリビオースによって誘導されることは多くの研究者が報告しているが^{10,11,12}、もし同様に*L. plantarum*のラクトース輸送系もメリビオースによって誘導されるなら、前述のようにラクトース輸送系はメリビオースを輸送するので、メリビオース添加培地にて37°Cで培養した菌体は³H-メリビオースを取込むはずである。しかしながら、Fig. 8に明らかなように、上記の条件で培養した菌体はまったく³H-メリビオースを取込まなかった。従って、*L. plantarum*のラクトース輸送系は*E. coli*の場合とは異なり、メリビオースによって誘導されないことが明らかになった。

*E. coli*のメリビオース代謝に必要な遺伝子は、プロモーター、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子、メリビオース輸送系遺伝子の順に染色体上でオペロンを構成しており、2つの構造遺伝子はまとめて転写される¹⁵。ところが、*L. plantarum*のメリビオース輸送系は37°Cで誘導されないにもかかわらず、ラクトース添加培地では30°Cおよび37°Cいずれの温度でも α -ガラクトシダーゼが誘導された。この結果は、本菌のメリビオース輸送系遺伝子と α -ガラクトシダーゼ遺伝子は、その遺伝子座が異なっており、同一のプロモーターの支配を受けない可能性を示唆した。また、本菌をメリビオース添加培地にて37°Cで培養すると、メリビオース輸送系が誘導されないだけでなく、 α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼも誘導されなかった。従って、*L. plantarum*においてはまず、メリビオース輸送系が誘

導され、菌体内にメリビオースが蓄積した後、 α -ガラクトシダーゼが誘導されると推察された。今後は、 α -ガラクトシダーゼおよびラクトース輸送系の活性を欠損した突然変異体を選抜して、メリビオース輸送系の性質をより詳細に研究したいと考えている。

結 論

1. *L. plantarum*は30°Cでメリビオースあるいはラフィノースを利用して増殖したが、37°Cでは増殖しなかった。
2. メリビオースの代謝系は、メリビオース輸送系と分解酵素 α -ガラクトシダーゼにより構成される。
3. α -ガラクトシダーゼは、30°Cおよび37°Cいずれの温度でも誘導された。また、本酵素はいずれの温度でも α -ONPGを分解し、30°Cにおける酵素活性は37°Cの約1.5倍であった。
4. メリビオース輸送系は、30°Cでは誘導されたが37°Cでは誘導されなかった。また、メリビオース輸送系は30°Cおよび37°Cいずれの温度でも³H-メリビオースを取込んだ。
5. 30°Cで誘導されたメリビオース輸送系は、37°Cで3時間インキュベートしても不活性化されなかった。
6. メリビオース代謝の高温感受性は、メリビオース輸送系が37°Cで誘導されないことが原因であると推察された。

稿を終えるに臨み終始御懇切なる御指導、御校閲を賜りました恩師金政泰弘教授に深謝申し上げます。併せて研究の遂行にあたり御援助、御協力いただきました友近健一先生、平井義一先生をはじめ細菌学教室の諸先生方に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 早川邦彦：食品・医薬品としての乳酸菌の効用。微生物 (1985) 1, 41-50.
- 2) 大山嘉信：サイレージ調製と微生物。化学と生物 (1977) 15, 434-442.
- 3) Mundt JO: Lactic acid bacteria associated with raw plant food material. J Milk Food Technol (1970) 33, 550-553.
- 4) Beckwith J: Restoration of operon activity by suppressors. Biochim Biophys Acta (1964) 76, 162--

- 164.
- 5) Pardee AB : An inducible mechanism for accumulation of melibiose in *Escherichia coli*. J Bacteriol (1957) **73**, 376—385.
 - 6) Prestidge LS and Pardee AB : A second permease for methyl-thio- β -D-galactoside in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta (1965) **100**, 591—593.
 - 7) Tanaka K, Niiya S and Tsuchiya T : Melibiose transport in *Escherichia coli*. J Bacteriol (1980) **141**, 1030—1036.
 - 8) Bailey RW and Bourne EJ : Colour reactions given by sugars and diphenylamine-aniline spray reagents on paper chromatograms. J Chromatogr (1960) **4**, 206—213.
 - 9) Winkler HH and Wilson TH : The role of energy coupling in the transport of β -galactosides by *Escherichia coli*. J Biol Chem (1966) **241**, 2200—2211.
 - 10) Rotman B, Ganesan AK and Guzman R : Transport systems for galactose and galactosides in *Escherichia coli*. II. Substrate and inducer specificities. J Mol Biol (1968) **36**, 247—260.
 - 11) Schmitt R : Analysis of melibiose mutants deficient in α -galactosidase and thiomethylgalactoside permease II in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol (1968) **96**, 462—471.
 - 12) Burstein C and Kepes A : The melibiose permease system of *Escherichia coli* K 12. Biochimie (1985) **67**, 59—67.
 - 13) Schmitt R and Rotman B : α -Galactosidase activity in cell-free extracts of *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun (1966) **22**, 473—479.
 - 14) Tsuchiya T, Lopilato J and Wilson TH : Effect of lithium ion on melibiose transport in *Escherichia coli*. J Membrane Biol (1978) **42**, 45—59.
 - 15) Hanatani M, Yazyu H, Shiota-Niiya S, Moriyama Y, Kanazawa H, Futai M and Tsuchiya T : Physical and genetic characterization of the melibiose operon and identification of the gene products in *Escherichia coli*. J Biol Chem (1984) **259**, 1807—1812.

**Analysis on the mechanism of the
temperature-sensitive melibiose metabolism
in *Lactobacillus plantarum***

Chiyuki TAMURA

Department of Microbiology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Y. Kanemasa)

L. plantarum can grow on melibiose when incubated at 30°C but not when incubated at 37°C. In this study, the temperature sensitivity of melibiose metabolism was analyzed. The melibiose metabolism seemed to consist of the melibiose transport system and hydrolyzing enzyme, α -galactosidase. α -Galactosidase was induced with melibiose at 30°C but not at 37°C. This enzyme induced at 30°C hydrolyzed colorimetric substrate, α -ONPG at 30°C and 37°C. On the other hand, lactose induced α -galactosidase at both temperatures. These findings suggested that the temperature sensitivity of melibiose metabolism was not due to the induction and/or function of α -galactosidase.

Thus, the effect of temperature on induction and function of the melibiose transport system was examined. Cells grown on melibiose at 30°C exhibited the rapid uptake of [^3H] -melibiose at 30°C and 37°C, while [^3H] -melibiose was not taken up by the cells grown at 37°C. The induction of the melibiose transport system seemed to be temperature-sensitive because the transport system was not inactivated by exposure of the cells to 37°C for 3 hours. In conclusion, the temperature sensitivity of melibiose metabolism was attributed to the temperature sensitivity of the induction of melibiose transport system.