

有胞子乳酸菌の分子系統に関する研究

鈴木智順

①

# 有孢子乳酸菌の分子系統に関する研究

(Molecular phylogenetic studies on spore-bearing lactic acid bacteria)

農芸化学 専攻

平成元年度博士課程入学

氏名 鈴木 智順

指導教官名 山里 一英

## 目 次

序章 序 論	1
第1章 実験方法	5
第1節 16S rDNA塩基配列に基づいた系統関係	5
1. 供試菌株	5
2. 培養条件	5
3. DNAの調製	5
4. PCRによる16S rDNA断片の増幅	6
5. PCR産物の精製	7
6. 塩基配列の決定	7
7. 系統樹の作成	8
第2節 染色体DNAのguanine plus cytosine (GC)含量	8
1. 供試菌株	8
2. 培養条件、及びDNAの調製	9
3. GC含量の測定	9
第3節 染色体DNAの相同性	9
1. 供試菌株	9
2. 培養条件、及びDNAの調製	10

3. 標識DNAの調製	10
4. DNA-DNA hybridization	10
第2章 実験結果	17
第1節 16S rDNA塩基配列に基づいた系統関係	17
1. 16S rDNA塩基配列	17
2. 16S rDNA塩基配列に基づいた系統関係	18
第2節 染色体DNAのGC含量	21
第3節 染色体DNAの相同性	21
第3章 考察	37
第1節 16S rDNA塩基配列に基づいた系統関係	37
第2節 染色体DNAのGC含量、及び相同性	41
第3節 16S rDNA塩基配列のs値とDNA相同値との関係	43
第4章 総括	48

参考文献 ..... 50

謝辞 ..... 61

## 序 章 序 論

有胞子乳酸菌は耐熱性内生胞子を形成し、ホモ乳酸発酵を行う桿菌で、グラム陽性細菌のDNA Low GCグループに属する。種としては、高温性、カタラーゼ陽性で、L(+)乳酸を生成する *Bacillus coagulans* Hammer (1915)、ならびに同じく中温性で、D(-)乳酸を生成する '*Bacillus laevolacticus*' Nakayama and Yanoshi (1967a)、DL乳酸を生成する '*Bacillus racemilacticus*' Nakayama and Yanoshi (1967a)、カタラーゼ陰性で、D(-)乳酸を生成する *Sporolactobacillus inulinus* Kitahara and Suzuki (1963)、'*Sporolactobacillus laevas*' 中山 (1970)、DL乳酸を生成する '*Sporolactobacillus racemicus*' 中山 (1970) 等が報告されている。また、*Sporolactobacillus*属と近縁であるが分類学的特徴付けのなされていない株も多数分離されている (Amemiya & Nakayama, 1980; 中山, 1970; Nakayama & Yanoshi, 1967b)。

*S. inulinus*は 1963年に鶏飼料より分離され、Kitahara and Suzuki により *Lactobacillus* 属の亜属として提唱された。その後 1967年に Kitahara and Lai (1967) により独立した属とし(1属1種: *S. inulinus*)、さらにその後、*Bacillaceae*科に移された (Kitahara & Toyota, 1972)。北原(1966)は有胞子乳酸菌について進化的な考察を行い、これを自然分類として次のような関係を述べている。 *Bacillus* → Wild-lactobacillus → *Lactobacillus* → *Sporolactobacillus* → *Clostridium*。30%グルコース含有培地よりはほぼ100%の乳酸を生成し、イヌリンを発酵して乳酸を生成することを特徴としている。*Sporolactobacillus*属に近縁な株に対し 中山 (1970)により新種が提唱された ('*S. laevas*', '*S. racemicus*') が、Kitahara (1974)はBergey's Manual, 8th. の中の *Sporolactobacillus*の種として記載せず、Approved Lists of Bacterial

Names にも含められなかった。

Sporolactobacillus属は、カタラーゼ陰性でホモ乳酸発酵を行う。乳酸菌としての表現形質を持つ反面、運動性が有り、内生胞子を作ることから、この属の表現型的特徴は、Bacillaceae科と Lactobacillaceae科との中間であるとされていた (Kitahara, 1974) が、化学分類学的指標、すなわち菌体脂肪酸組成において主要な脂肪酸が分枝脂肪酸であること (Uchida & Mogi, 1973)、メナキノン-7の存在 (Collins & Jones, 1979)、ムレインがジアミノピメリン酸型であること (岡田ら, 1976) などにより Bacillaceae科の特徴を示すことが明らかとなった。また、16S rRNAカタローギングによる遺伝子型から Lactobacillusの種ではなくて Bacillusの種と近い関係にあることが示された (Fox et al., 1977)。しかしながら、S. inulinus はヘムタンパク質を欠きカタラーゼ、チトクロームオキシダーゼ陰性であることから、現在では、Bacillaceaeの中 Bacillusとは別の属として位置付けられている (Kandler & Weiss, 1986)。

Bacillus属は好気性、一部通性嫌気性のグラム陽性胞子形成桿菌である。この属は表現型が非常に多様で生育温度は約15~65℃、生育pHは約 2~10、そしてDNAのGC含量が約33~69%の種を含んでいる (Claus & Berkeley, 1986)。この属の分類学的研究はその内生胞子の形、及び胞子囊の膨らみかたによるグルーピング (Gordon et al., 1973)、生理・生化学的性状に基づいた分類 (Loagan & Berkeley, 1981; Priest et al., 1981; Priest et al., 1988)、及び菌体脂質や脂肪酸組成、呼吸系補酵素、に基づいた化学分類 (Claus & Berkeley, 1986; Hess et al., 1979; Minnikin & Goodfellow, 1981) や、染色体DNAの相同性 (Hanger & Claus, 1981; Nakamura et al., 1988; Priest, 1981; Seki et al., 1978; Somerville & Jones, 1972; Takahashi et al., 1966) などで行われてきたが、属や種の系統的關係についての理解は極めて不

十分であった。

この問題を解決する一つの有効な手段として、進化の過程を通じて保存性の高い遺伝子、例えば 16S rRNA の塩基配列を比較する方法がある (Woese, 1987)。当初、塩基配列を決定することが困難であったため、16S rRNA カタログ法 (Fox, et al., 1977; Stackebrandt et al., 1987; Woese et al., 1976) が行われていた。この方法はリボヌクレアーゼ<sub>T1</sub>により切断した RNA断片の種類に基づいて、供試した菌株間の類似度を求める方法である。しかし、比較に用いられる塩基の数が少ないことなどから属以下の分類群に対しては有効ではなかった。その後、Sanger et al. (1977)により塩基配列の決定が容易になってきたこと、また、Lane et al. (1985)による逆転写酵素を用いた16S rRNAガイドデオキシシーケンス法が確立されたことにより、多くの細菌、及び真核微生物の16S様 rRNAの塩基配列が決定されるようになってきた。また、rRNAは実験中リボヌクレアーゼの汚染をうけて分解されやすい。そこで、16S rRNA遺伝子 (rdna)をPCRにより増幅させ、これをシーケンスに用いる方法が開発され、さらに塩基配列の決定が容易になってきた。Bacillus属細菌においても最近、報告が出されてきている (Ash et al., 1991a; Ash et al., 1991b; Farrow et al., 1992; Roessler et al., 1991; Wisotzkey et al., 1992)。

本研究においては、有孢子乳酸菌を含む好気性、通性嫌気性の Bacillaceaeの分子系統を明らかにする目的で、16S rdnaの塩基配列の決定を行っていたが、Ash et al. (1991b)は別個にBacillus属51種の16S rRNAの塩基配列を決定し、発表した。彼らは、Bacillus属に含まれる種、及び関連細菌の16S rRNAの塩基配列を決定し、この属が系統的に大きく5つのグループに分けられることを報告した。この報告では、いくつかの種、及び S. inulinus は ungrouped branchとして示された。



Bacillus属に含まれている種のうち、有胞子乳酸菌であるカタラーゼ陽性の 'B. laevolacticus'、'B. racemilacticus' と、カタラーゼ陰性の S. inulinus とは系統的に極めて近く、系統的に独立したグループを形成することを見いだした。そこで、さらに多くの供試菌株を加えて16S rDNAの塩基配列を決定し、この配列より進化速度を計算して、これら菌種の系統的關係を明らかにした。

細菌の系統關係を明らかにすることについては、16S rRNAの塩基配列の比較は属以上の高次レベルの分類群に対しては有効であるが、種レベルでの類縁關係は塩基置換数がさほど蓄積していないので、有意な区別がつきにくいとされている。そこで、有胞子乳酸菌の属の広がりを評価するためにDNA-DNA 交雑実験も行った。

## 第 1 章 実 験 方 法

### 第 1 節 16S rDNA塩基配列に基づいた系統関係

#### 1. 供試菌株

本実験に用いた菌株をTable 1-1 に示す。カタラーゼ陰性の有胞子乳酸菌としては *S. inulinus* JCM 6014<sup>T</sup> (基準種、基準株)、*S. inulinus* NRIC 1134、中山ら分離、報告の *Sporolactobacillus* spp. 8株、カタラーゼ陽性の有胞子乳酸菌としては、中山ら分離、報告の *Bacillus* spp. 5株である。*Bacillus*としては DNA G+C含量、胞子、及び胞子囊の形状、その他の表現型を考慮して選定し、11種の基準株を供試した。

なお、本研究においては、中山ら分離、報告の株については便宜上 IAM番号でなく、中山らの株番号を用いた。

#### 2. 培養条件

*Bacillus lentus* IAM 12466<sup>T</sup>は Trypticase Soy broth 10mlで26℃にて振盪培養を行った。その他の *Bacillus*は Nutrient broth 10mlで 30℃にて振盪培養を行った。ただし、*Bacillus psychrophilus* IAM 12468<sup>T</sup>は15℃で行った。カタラーゼ陰性の有胞子乳酸菌はGYP broth 30mlで30℃にて静置培養を行い、カタラーゼ陽性の有胞子乳酸菌はGYP broth 10mlで30℃にて振盪培養を行った。各培地の組成はTable 1-2に示した。

#### 3. DNA の調製

DNA は Saito and Miura のフェノール法 (1963) に準じて調製した。対数後期の培養から菌体を遠心、集菌して Tris-EDTA (30mM Tris·HCl, 1mM EDTA; pH 8.0) に懸濁し、凍結・融解処理後、リゾチームを最終濃度 20mg/ml になるように添加した。37℃ に 30 分間保温後、SDS を最終濃度 0.5% になるように添加し、60℃、10 分間、溶菌した。溶菌液と等量の フェノール・クロロホルム (0.1M Tris·HCl; pH 8.0 で繰り返し飽和させ、pH を約 8.0 とし、0.2% 2-メルカプトエタノール、及び 0.1% 8-ヒドロキシキノリンを含有したフェノールと等量のクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) を混合) を加えて振盪、タンパク質を変性させ、遠心後、上清を分取した。このフェノール処理を繰り返した後、エタノール沈澱し、粗 DNA を 0.1X SSC (1X SSC: 0.15M NaCl, 15mM クエン酸ナトリウム) に溶解した。最終濃度 50 $\mu$ g/ml となるように RNase を添加し、37℃ に 30 分間保温後、フェノール処理を行った。イソプロパノール沈澱し、エタノールでリンス後、精製水に溶解した。

#### 4. PCR による 16S rDNA 断片の増幅

PCR は 500 $\mu$ l 容のチューブ内で、反応液 100 $\mu$ l にミネラルオイル 100 $\mu$ l を重層し、Thermal Reactor (Hybaid Ltd., Hook & Tucker Instrument, Ltd.) を用いて行った。反応液の組成は、染色体 DNA 100ng, 10X PCR reaction buffer (500mM KCl, 100mM Tris·HCl; pH 8.3, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% (w/v) gelatin) 10 $\mu$ l、それぞれ 0.2mM の dATP, dCTP, dGTP, dTTP、それぞれ 0.001mM の増幅用プライマー (9F, 1540R: Table 1-3)、及び Ampli-Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus) 5 units とした。

反応はまず、94℃ で 2.5 分間プレインキュベートした後、94℃ で 1 分間熱変性し、58℃ で 2.5 分間アニーリングし、72℃ で 2.5 分間伸長反応を行うことを 1 サイクルとして 30 サイクル行い、最後に 72℃ で 5 分間伸長反応を行った。

## 5. PCR産物の精製

クロロホルムを加えて反応液からミネラルオイルを除去後、フェノール処理し、イソプロパノール沈澱を行った。エタノールでリンスした後、増幅したDNAを TE buffer (10mM Tris·HCl, 1mM EDTA; pH7.5) に溶解し、1% Agarose S (Nippon Gene Co., Ltd.) ゲル電気泳動を行い、16S rDNA断片に相当するバンドを切り出した。

ゲルからの DNAの回収は EASYTRAP (Takara Shuzo Co., Ltd.) を用いて行った。ゲル重量の3倍量のNaI溶液 (NaI 90.8g, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 1.5g in 100ml water) を加え、55℃で10分間保温してアガロースを溶解した。回収する DNA量の5倍量のガラスパウダーを添加し、十分に懸濁後、水中に10分間放置して DNAを吸着させた。遠心後、再び NaI溶液を加え残存する少量のアガロースを拡散させ、さらに遠心して上清を捨てた。-20℃で冷やした洗浄用緩衝液 (エタノール : 緩衝濃縮液 = 1 : 1, 緩衝濃縮液: 0.1M NaCl, 10mM Tris·HCl, 1mM EDTA; pH 7.5) を加えて懸濁遠心して NaI 溶液を除去した。この操作を繰り返した後、DNA-ガラスパウダーにTE bufferを加え55℃に10分間保温してDNAを抽出した。さらにこの操作を繰り返して DNA抽出液を合わせた。イソプロパノールによりDNAを沈澱させ、10mM Tris·HCl (pH7.5) に溶解した。

## 6. 塩基配列の決定

PCRにより得られた16S rDNA断片の塩基配列は dideoxy nucleotide chain termination法 (Sanger, 1977) により決定した。この反応には、[ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP (Amersham Corp.)、及び Sequenase kit (version 2.0; U. S. Biochemical Corp.) を用いて行った。テンプレート DNA は シークエンシングプライマー (Table 1-3) と snap cooling (95℃で 5分間加熱し、水中で急冷) によりアニーリングした。これにラベリングミックス溶液 (それぞれ1.5 $\mu$ Mの dGTP, dCTP, dTTP)、Mn buffer (0.15M イソクエン酸ナトリウム, 0.1M MnCl<sub>2</sub>)、0.1M DTT、

sequenase 及び 0.185MBq の [ $\alpha$ - $^{35}$ S]dATPを加えてラベリング反応を室温で 2 分間行った。直ちにターミネーション反応を37℃で行い、5分後に反応停止液 (95% ホルムアミド, 20mM EDTA, 0.05% プロモフェノールブルー, 0.05% キシレンシアノール FF)を添加した。シーケンシングの結果バンド間の圧縮の見られた領域はキット中の dGTP溶液をdITP溶液に変えて同様に行った。

得られた DNA断片はシーケンシングゲル 0.5% HydroLink Long Ranger (AT Biochem) により分離した。電気泳動は 25cm X 45cm X 0.35mmのゲルを用いて、27Wの定電力で、約 2時間30分間行った。このゲルは酢酸・メタノールによる尿素の除去を行う必要がないので、直ちにゲルを真空乾燥して、オートラジオグラフィーを行った。

## 7. 系統樹の作成

得られた塩基配列を既に決定されている *B. subtilis* の16S rRNA (Green et al., 1985) に対して、2次構造を考慮にいれてアライメントした。このアライメントを基に進化距離  $K_{nu}$ 。 =  $-(1/2) \ln\{(1-2P-Q)(1-2Q)1/2\}$  (Kimura, 1980)を計算した。ここで、P、及び Q は比較している2つの塩基配列の間で、それぞれトランジション、及びトランスバージョン型の塩基置換の起きている塩基部位の数である。この算出された進化距離から近隣結合法(Saitou, 1987)により系統樹を作成した。

## 第2節 染色体DNA の guanine plus cytosine (GC)含量

### 1. 供試菌株

本実験に用いた菌株はTable 1-4 に示す。

## 2. 培養条件、及び DNAの調製

第1節と同様に行ったが、ここではさらに精製 DNAを0.1X SSCに溶解後、4℃で一昼夜、透析を行った。

## 3. GC含量の測定

染色体 DNAのGC含量の測定は、DNA-GC Kit (Seikagaku Kogyo Co., Ltd.) を用いた高速液体chromatography法 (Katayama-Fujimura, et al., 1984)で行った。DNA 溶液 (1mg/ml) 10 $\mu$ lを熱変性し、急冷して1本鎖 DNAとした。この溶液に nuclease P<sub>1</sub>溶液 (0.1mg/ml of 40mM CH<sub>3</sub>COONa, 0.2mM ZnCl<sub>2</sub>; pH5.3) 10 $\mu$ lを添加して50℃で2時間、1本鎖 DNAを nucleotide に分解した。この塩基組成をShimadzu high performance liquid chromatograph LC-6A (Shimadzu Co.)、及びShimadzu UV-VIS spectrophotometric detector SPD-6AVにより270nmの波長で測定した。カラムは逆相分配のODS(C18)系、YMC pack AQ-312 (6.0mm X 150mm, YMC Co., Ltd.)とし、移動相は 10mM phosphate buffer (pH3.5) を用いて、流速を1.4ml/minとした。各nucleotideの量はstandard nucleotideで割ったモル分率として得られ、その値からGC含量を求め、*E. coli* strain B (51.6 mol%)により補正を行った。

## 第3節 染色体DNAの相同性

### 1. 供試菌株

本実験に用いた菌株はTable 1-5 に示す。

## 2. 培養条件、及び DNAの調製

第2節と同様に行った。

## 3. 標識 DNAの調製

染色体 DNAを [1', 2', 5' -<sup>3</sup>H]dCTP (Amersham Corp.)、及び Nick Translation Kit 2 (Nippon Gene Co., Ltd.)を用いて標識した。14℃で2時間反応後、phenol処理を行い1/2倍量の7.5M ammonium acetate (pH7.5)、及び3倍量のethanolによって標識DNAを沈澱させ、0.1X SSCに溶解した。

## 4. DNA-DNA hybridization

Denhardt(1966)、及び Bonner et al. (1967)らによる membrane filter法により行った。OD<sub>250</sub> = 2 位に調製した未標識DNAを熱変性により1本鎖とした後、10X SSCを加えて2X SSC溶液とし、さらにOD<sub>260</sub>を1.00に調製した。membrane filter (cellulose nitrate, 0.45µm pore size, Advantec Toyo, Ltd.)を2X SSCで洗浄後、1本鎖DNA溶液1mlを2分間かけて吸引濾過した。十分に引き切ってから2X SSCで洗浄、風乾後、80℃で3時間、焼き付けを行ってfilter上に固定した。

このfilter1枚当たり10,000cpmとなるように標識DNAを0.1X SSC溶液に取り、超音波処理をして断片化後、熱変性により1本鎖として2X SSC溶液に調製した。この溶液に最終0.1% (v/v)となるように25% SDS溶液を加えて反応液とした。未標識1本鎖DNAが固定されたfilterの入った反応vialに反応液を加えて60℃で48時間反応を行った。

反応終了後、filterをvialより取り出して、2X SSC、及び5mM Tris (pH無調整)により洗浄を行った。filterを風乾後、放射活性をBeckman LS-7800





Table 1-1. Strains used for the determination of 16S rDNA sequences.

Species	Strain number	Nakayama*
<u>Bacillus cereus</u>	IAM 12605 <sup>T</sup>	
<u>Bacillus coagulans</u>	IAM 12463 <sup>T</sup>	
<u>Bacillus firmus</u>	IAM 12464 <sup>T</sup>	
<u>Bacillus laterosporus</u>	IAM 12465 <sup>T</sup>	
<u>Bacillus lentus</u>	IAM 12466 <sup>T</sup>	
<u>Bacillus megaterium</u>	IAM 13418 <sup>T</sup>	
<u>Bacillus pantothenicus</u>	IAM 11061 <sup>T</sup>	
<u>Bacillus polymyxa</u>	IAM 13419 <sup>T</sup>	
<u>Bacillus psychrophilus</u>	IAM 12468 <sup>T</sup>	
<u>Bacillus sphaericus</u>	IAM 13420 <sup>T</sup>	
<u>Bacillus thuringiensis</u>	IAM 12077 <sup>T</sup>	
* <u>Bacillus laevolacticus</u> *	IAM 12321	M8
* <u>B. laevolacticus</u> *	IAM 12322	M1
* <u>Bacillus myxolacticus</u> *	IAM 12326	M105
* <u>Bacillus racemilacticus</u> *	IAM 12318	M14
* <u>B. racemilacticus</u> *	IAM 12319	M5
<u>Sporolactobacillus inulinus</u>	JCM 6014 <sup>T</sup>	
<u>S. inulinus</u>	NRIC 1134	
* <u>Sporolactobacillus dextrus</u> *	IAM 12380	M15
* <u>Sporolactobacillus laevas</u> *	IAM 12388	M114
* <u>S. laevas</u> *		M18
* <u>Sporolactobacillus laevas</u> ssp. <u>intermedius</u> *	IAM 12384	M86
* <u>S. laevas</u> ssp. <u>intermedius</u> *	IAM 12387	M103
* <u>Sporolactobacillus racemicus</u> *	IAM 12395	M16
* <u>S. racemicus</u> *	IAM 12396	M17
* <u>S. racemicus</u> *		M116

T: Type strain.

\*: Strain name of O. Nakayama.

Table 1-2. Compositions of media used in this study.

Trypticase Soy broth (BBL)		Nutrient broth (Kyokuto)	
Pancreatic Digest of Casein	17.0g	Meat Extract	7.0g
Papaic Digest of Soybean Meal	3.0g	Peptone	10.0g
NaCl	5.0g	NaCl	3.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5g	D. W.	1,000ml
Glucose	2.5g		pH 7.0
D. W.	1,000ml		
	pH 7.3		

GYP broth

Glucose	20g
Yeast extract	10g
Peptone	10g
CH <sub>3</sub> COONa	10g
Solution B	5ml
Tween 80 Sol.	10ml
D. W.	1,000ml
	pH 6.8

Solution B

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1g
NaCl	0.1g
D. W.	50ml

Tween 80 Sol.

Tween 80	2.5g
D. W.	50ml

Table 1-3. Sequences of oligonucleotides used as primers in this study.  
Positions refer to *E. coli* 16S rRNA numbering.

Code	5' to 3'	Position ( <i>E. coli</i> )
9F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	9-27
120R	GTGTTACTCACCCGTCC	123-107
350R	CTGCTGCCTCCCGTA	357-343
530R	GTATTACCGCGGCTGCTG	536-519
700F	TAGCGGTGAAATGCGTAGA	686-704
700R	TCTACGCATTTACCGCTAC	704-685
800R	CTACCAGGGTATCTAATC	803-786
920R	CCGTCAATTCATTGAGTTT	926-907
1110R	AGGGTTGCGCTCGTTG	1115-1100
1240R	CATTGTAGCACGTGTGTA	1241-1224
1400R	CGGTGTGTACAAGGCC	1401-1385
1510R	GGCTACCTTGTTACGACTT	1510-1492
1540R	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	1544-1525

Table 1-4. Strains used for the determination of G+C content of DNA.

Species	Strain
* <u>Bacillus laevolacticus</u> *	M8 (=IAM 12321)
	M1 (=IAM 12322)
* <u>Bacillus myxolacticus</u> *	M105 (=IAM 12326)
* <u>B. racemilacticus</u> *	M5 (=IAM 12319)
<u>Sporolactobacillus inulinus</u>	JCM 6014 <sup>T</sup>
	NRIC 1134
* <u>Sporolactobacillus dextrus</u> *	M15 (=IAM 12380)
* <u>Sporolactobacillus laevas</u> *	M114 (=IAM 12388)
	M18
* <u>Sporolactobacillus racemicus</u> *	M16 (=IAM 12395)
	M17 (=IAM 12396)

Table 1-5. Strains used for DNA-DNA hybridization.

Species	Strain
* <u>Bacillus laevolacticus</u> *	M8 (=IAM 12321)
	M1 (=IAM 12322)
* <u>Bacillus myxolacticus</u> *	M105 (=IAM 12326)
* <u>B. racemilacticus</u> *	M5 (=IAM 12319)
<u>Sporolactobacillus inulinus</u>	JCM 6014 <sup>T</sup>
	NRIC 1134
* <u>Sporolactobacillus laevas</u> *	M114 (=IAM 12388)
	M18
* <u>Sporolactobacillus racemicus</u> *	M16 (=IAM 12395)
	M17 (=IAM 12396)

## 第2章 実験結果

### 第1節 16S rDNA塩基配列に基づいた系統関係

#### 1. 16S rDNA塩基配列

本実験に供試した26株について PCRにより増幅された16S rRNA遺伝子断片のほとんど全ての塩基配列(約1,500b)を決定した。これら決定した塩基配列を *B. subtilis* の16S rRNA遺伝子の塩基配列に対してアライメントした図を Fig. 2-1に示す。

決定した塩基配列の中でV1領域(Gray et al., 1984; Neefs et al., 1990) (ポジション72~105, *E. coli* numbering system, Brosius et al., 1978) は塩基の置換、欠失、及び挿入が多く、アライメントすることが不可能なので進化距離の計算からは除外した。この部分領域での塩基置換、及び挿入の多かったのは *B. pantothenicus* であったが、全体の塩基配列からみた進化距離では *B. subtilis* とはそれほど遠い関係ではなかった。同様に '*B. racemilacticus*' M5でもこの部分領域でアライメントが極めて困難な塩基置換がみられた。また、かなり多くの欠失がみられたのは *B. laterosporus*、及び '*S. dextrus*' M15 であった。この部位は、これを除く部位の塩基配列から計算された進化距離とはほとんど無関係に、塩基の置換、欠失、及び挿入が生じていると考えられる。Table 2-1 は、V1領域、アライメントにより生じたギャップ、及び未決定の塩基を除いた1,446bの比較による16S rDNAのs値(similarity value)を示した表である。供試した *Bacillus* 属の菌種間でのs値は、最も低い値が88.4%、最も高い値が、同種とされている *B. cereus* - *B. thuringiensis* 間の99.9%を除

いて、96.6%であり、この属の遺伝的な多様性を示した。

データベースに登録されている塩基配列においても、*B. aneurinolyticus*ではポジション461~471、*B. azotoformans*ではポジション463~469において他とアライメントが不可能であった。

## 2. 16S rDNA塩基配列に基づいた系統関係

参照した塩基配列は決定されている塩基数が、本研究において決定した塩基数よりも少ないので、進化距離の計算には約1,300bを利用した。

塩基配列を決定した26株、及び参照株15株、計41菌株について16S rDNAの塩基配列を基に進化距離 $K_{nu}$ を計算し、近隣結合法により系統図を作成した。これをFig. 2-2に示す。

供試した*Bacillus*属細菌は、16S rDNA塩基配列のs値、及び系統樹 (Fig. 2-2)のトポロジーにより大きく6つのグループに分かれた。

*Bacillus*菌種の系統関係については、本研究実施中に、Collinsのグループ (Ash et al., 1991b) が51種を供試した解析結果を報告した。彼らの比較した塩基数はポジション107から1410までの1,332塩基であり、16S rRNAの3'末端近くのヘリックス39は塩基配列の決定を行っていない。本研究ではヘリックス39も含めて約1,500の塩基を決定したが、大筋において、Ash et al. (1991b)と同様の結果を得た。

彼らは*Bacillus*を大きく5つのグループに分けている。そのグルーピングに従うと、グループ1は、*Bacillus*属のType speciesである *B. subtilis*を含む大きなグループで、*B. coagulans*、及びカタラーゼ陰性の *B. azotoformans*もここに位置した。このグループ内に位置している *B. cereus*と *B. thuringiensis*との16S rDNAの塩基配列は、決定した1,510bのうち4bのみが異なっていた。このことは、これらの菌種がDNA相同性による研究において同一種とみなされていること (Seki et al., 1978; Somerville & Jones, 1972)を系統的に支

持するものである。グループ2には、球状の胞子を形成し、ムレインにリジンまたはオルニチンを含む菌種が位置した。グループ3は、B. polymyxa、及び B. amylolyticus、グループ4は、B. laterosporus、そしてグループ5は、好熱性細菌である B. stearothermophilus、及び B. thermoglucosidasius が属した。これら各グループ間の進化距離は遠く、系統的にそれぞれを別属として分けられる関係にある、と示唆された。

S. inulinus は、Ash et al. (1991b) の系統図では ungrouped branch とされていた。本研究において、数多くの有孢子乳酸菌を供試して 16S rDNA の塩基配列を比較したところ、Fig. 2-2 で示すとおり、1 つの系統的にまとまったグループを構成した。このグループを形成している菌株は全て有孢子乳酸菌であり、他の *Bacillus* 属の各グループとは進化的に遠く離れ、第6番目のグループを構成することが明かとなった。

供試した有孢子乳酸菌は、次のように系統的に2つのブランチ (B-1, B-2) に分かれた。

ブランチB-1

B-1c

SG-1

S. inulinus JCM 6014<sup>T</sup>

S. inulinus NRIC 1134

\*S. laevas ssp. intermedius\* M86.

SG-2

\*S. racemicus\* M16

\*S. racemicus\* M116.

SG-3

\*S. laevas ssp. intermedius\* M103

\*S. laevas\* M114



\*S. racemicus\* M17.

SG-4

\*S. laevas\* M18.

SG-5

\*B. laevolacticus\* M8

\*B. laevolacticus\* M1

\*B. racemilacticus\* M14

\*B. myxolacticus\* M105.

B-1<sub>M5</sub>

\*B. racemilacticus\* M5

ブランチB-2

\*S. dextrus\* M15

B-1は、カタラーゼ陰性である Sporolactobacillus 3種、9株、及びカタラーゼ陽性の Bacillus 3種、4株からなるクラスター (B-1c)。並びに、これらとはやや離れているカタラーゼ陽性の \*B. racemilacticus\* M5 (B-1<sub>M5</sub>)から形成された。B-1cとB-1<sub>M5</sub>との16S rDNAのs値は94.7%で、比較的高い塩基配列の相同性を示した。

もう一方のブランチの B-2 はカタラーゼ陰性である \*S. dextrus\* M15、1株であった。これは B-1とはかなり系統的に離れており、16S rDNAのs値は90.9~92.5%と、かなり低い値を示した。この B-2ブランチは B. subtilisを含むグループ1の中に位置していたが、このグループのメンバーでホモ乳酸発酵によりL(+)乳酸を生成する B. coagulansとは系統的に離れていた。

B-1cは、さらに5つのサブグループ(SG-1~5)に分けられた。

B-1cのメンバーの16S rDNA塩基配列のs値、及び塩基の相違数をTable 2-2に示した。比較した塩基数は V1領域をも含め、アライメントによるギャップを除いた1,474bを用いた。B-1cにおいて、互いの株間における塩基配列のs値

は97.2%以上、塩基の相違数は42b以下であり、各サブグループ間では、97.2～99.0%、14～42bであった。また、各サブグループ内では、SG-1が99.9%以上、1b以下、SG-2が99.9%以上、1b以下、SG-3が99.8%以上、3b以下、SG-5が99.7%以上、4b以下、となっていた。

## 第2節 染色体DNAのGC含量

有孢子乳酸菌の染色体DNAのGC含量を高速液体chromatographyにより測定した結果をTable 2-3に示した。有孢子乳酸菌のGC含量は37.3～46.6 mol%の範囲を示した。*B. racemilacticus* M5は37.3 mol%、*S. dextrus* M15は39.4 mol%となり、16S rDNAの塩基配列の比較によって系統的にまとまったクラスタ-B-1cは42.1～46.6 mol%の範囲となった。本実験の結果から*S. inulinus* JCM 6014<sup>T</sup>のGC含量は46.6 mol%であったが、Suzuki and Kitahara (1964)は paper chromatography 法により39.3 mol%、Miller et al. (1970)は熱変性(T<sub>m</sub>)法により47.3 mol%、Yanagida et al. (1987)はT<sub>m</sub>法により47.0 mol%と報告されている。本実験結果はT<sub>m</sub>法により得られた値とほぼ一致した。

## 第3節 染色体DNAの相同性

有孢子乳酸菌の染色体DNAの相同性の結果をTable 2-4に示す。*Sporolac-*

tobacillus属のtype species, type strainである S. inulinus JCM 6014<sup>T</sup>、及びカタラーゼ陽性でSG-5に含まれている 'B. laevolacticus' M8のDNAを標識し、それぞれ同じ株どうしを交雑させたときの値を100%として各菌株との相同値を算出した。

S. inulinus JCM 6014<sup>T</sup> を標識株としたとき、同じサブブランチ SG-1 である S. inulinus NRIC 1134は 91%、SG-2である 'S. racemicus' M16 は 35%、SG-3である 'S. laevas' M114 は36%、'S. racemicus' M17は 24%、SG-4である 'S. laevas' M18は33%、SG-5である 'B. laevolacticus' M8は24%、'B. laevolacticus' M1 は24%、'B. myxolacticus' M105 は34%の相同値を示し、B-1cに含まれている菌株との相同値は 24%以上となった。同じB-1である 'B. racemilacticus' M5とは7%の相同値であった。

'B. laevolacticus' M8 を標識株としたとき、同じサブブランチSG-5である 'B. laevolacticus' M1 は93%、'B. myxolacticus' M105は84%、SG-1である S. inulinusJCM 6014<sup>T</sup>は 27%の相同値を示し、この時、B-1cに含まれている菌株の相同値は27%以上となった。また、S. inulinus JCM 6014<sup>T</sup>を標識株としたときと同様に、'B. racemilacticus' M5とは9%の相同値であった。

1. *B. subtilis*
2. *B. firmus* IAM 12464<sup>T</sup>
3. *B. lentus* IAM 12466<sup>T</sup>
4. *B. cereus* IAM 12605<sup>T</sup>
5. *B. thuringiensis* IAM 12077<sup>T</sup>
6. *S. dextrus* M15
7. *B. megaterium* IAM 13418<sup>T</sup>
8. *B. coagulans* IAM 12463<sup>T</sup>
9. *B. pantothenicus* IAM 11061<sup>T</sup>
10. *B. psychrophilus* IAM 12468<sup>T</sup>
11. *B. sphaericus* IAM 13420<sup>T</sup>
12. *B. polymyxa* IAM 13419<sup>T</sup>
13. *B. laterosporus* IAM 12465<sup>T</sup>
14. *S. inulinus* JCM 6014<sup>T</sup>
15. *S. inulinus* NRIC 1134
16. *S. laevis* ssp. *intermedius* M86
17. *S. racemicus* M16
18. *S. racemicus* M116
19. *S. laevis* ssp. *intermedius* M103
20. *S. laevis* M114
21. *S. racemicus* M17
22. *S. laevis* M18
23. *B. laevolacticus* M8
24. *B. laevolacticus* M1
25. *B. racemilacticus* M14
26. *B. myxolacticus* M105
27. *B. racemilacticus* M5

30

72

GACGAACGUCGGCGGUCUUAUACAUGCAAGUCGAGCGGACAGG  
 -----G-A  
 -----A-UG-A  
 --U-----A-UG-A  
 --U-----A-UG-A  
 --U-----A.....  
 --U-----A--U-A  
 -----U-----CUU  
 -----C  
 -----A-----AU-A  
 -----A-----A  
 -----GGUUA  
 -----A.....  
 -----C-----A  
 -----C-----A  
 -----C-----A  
 -----C-U--A  
 -----C-U--A  
 -----C-UU--  
 -----C-UU-A  
 -----C-UU-A  
 -----C-----A  
 -----C-U--A  
 -----C-UC-A  
 -----C-U--A  
 -----C-UC-A  
 -----C

- 100
1. ··UGGGAGCUUGCUC·CGA···UGUU·AGCGCGGACGGGUGAGUAAACGUGGGUAAACCGUCGUGUAAAGACUGGGUAAACUCGGGAAACCGGG
  2. -----AC-----C-C-----C-----
  3. -----C--nAA-----C-----A-----U-----A
  4. -U-AA-----UU--UGAA-----CA-----
  5. -U-A-----UC--AGAA-----CA-----
  6. ······CC--CGGG······A-----U-----UA
  7. -U-A-A-----U--U--UGAC-----C-----U-----A-
  8. -U-AA-A-----U-UU-AAAG-----C-----n-----G-----
  9. -----C-----A-----
  10. --C-A-----UCU--GA-U-----C-----CUAC--UG-----
  11. -GAA-----UU--GAC-----C-----A--CUAU--UU-----
  12. AU-A-A-----U--U-ACUAACC-----A-C-----CAC--UU-----A-C-----G-UA
  13. -----UCU-C-GA--C-----A-C-----AUA-----UUAU
  14. --A-----nG--GAC--G-----U-----C-----n-----U-----A
  15. --A-----Un-GAC--G-----U-----C-----n-----U-----A
  16. --A-----nG--GAC--G-----U-----C-----n-----U-----A
  17. --A-----Cn-nAA--G-----U-----C-----GU-----CA
  18. --A-----Cn-nAA--G-----U-----C-----GU-----CA
  19. -----CG-GA--G-----U-----C--U-----GU-----CA
  20. --A-----n-----Cn-GA--G-----U-----C--U-----GU-----CA
  21. --A-----Cn-GA--G-----U-----C--U-----GU-----CA
  22. --G-----n-----CU-GAG--G-----U-----C-----C-----GU-----CA
  23. --A-----CU--nAA--G-----U-----C-----C-UC-----GU-----CA
  24. -----CU-GAA--G-----U-----C-----C-UC-----GU-----CA
  25. --A-----CU--GAA--G-----U-----C-----C-UC-----GU-----CA
  26. -----CU-GAA--G-----U-----C-----C-UC-----GU-----CA
  27. -----C-----G-----U-----

1. GCUAAUACCGGAUGG·UUGUUGAACCGGAUGGUCAAACAUA AAAAGGUGCUUG·GCUACCACUUCAGAUAGACCCGCGCGCAUUGCUAGU  
 2. -----AA--GC--UCCU-----AGGA--GC-G--A--A-UC--U-----G-----  
 3. -----AAC--CC--UCCU-U-C--AGA--GGU-G--AC-----GU-----G-----  
 4. -----AA-CAU-----G--AU-G--C-----GU-----UG-----U-----  
 5. -----AA-CAU-----U-----G--AU-G--C-----GU-----UG-----U-----  
 6. -----AA-A-U--C-GUU-A--AAC-G--AUGG--C--UU--GU--U-----  
 7. -----A-GAUC--CUC-UU---GAG-UGAU-G--A--U-----U-----G-----U-----  
 8. -----n--A--U--CCU-----AGG--A-GG--C-----G-----G-----  
 9. -----A--ACA-AUCGUC--ACGAG-UGUUG--C--A-AU--GU-----G-----  
 10. -----A-AA--CAG--UGU-----ACA--CUC-G--AC-U-----GU--GUAG--G-----  
 11. -----A-AA--CU--UC-U--GA--UAC-G--AC--U-C--GU-G-AUAG--G-----  
 12. -----C--C-C-CC--UUC-U--GAG--GG-GG--C--AGCAA-U--GU--GUG--G--U-----  
 13. -----A--GGU--CUU--C--AAG-G--ACGG--A--GCAA--U-----G--U-----  
 14. -----AA--CCC-C-C-----G-G-GGU-G--A--U--C-U-----G--U--U--U-----  
 15. -----AA--CCC-C-C-----G-G-GGU-G--A--U--C-U-----G--U--U--U-----  
 16. -----AA--CCC-C-C-----G-G-GGU-G--A--U--C-U-----G--U--U--U-----  
 17. -----AA--CCCC--C-----G--GGG-G--A--U--C-U--G--G--U--U--U-----  
 18. -----AA--CCCC--C-----G--GGG-G--A--U--C-U--G--G--U--U--U-----  
 19. -----A--A--CCCC--C--A--G--GGU-G--A--U--C-U--G--G--U--U--U-----  
 20. -----A--A--CCCC--C--A--G--GGU-G--A--U--C-U--G--G--U--U--U-----  
 21. -----A--A--CCCC--C--A--G--GGU-G--A--U--C-U--G--G--U--U--U-----  
 22. -----AA--CC-C-C-----G--GGU-G--A--U--C-U--G--G--U--U--U-----  
 23. -----AA--CC--C-C-----G-GG-GU-G--A--U--C-U--G--G--U--U--U-----  
 24. -----AA--CC--C-C-----G-GG-GU-G--A--U--C-U--G--G--U--U--U-----  
 25. -----AA--CC--C-C-----G-GG-GU-G--A--U--C-U--G--G--U--U--U-----  
 26. -----AA--CC--C-C-----G-GG-GU-G--A--U--C-U--G--G--U--U--U-----  
 27. -----G-AA--CU--C-U-----A-G--GGG--A--U--C-U-G-----G--U--U--U-----

1. UGGUGAGGUAAACGGUCACCAAGGCCAACAUGCGUAGCCGACUGAGGGUGAUCGGCCACACUGGGACUGAGACACGGCCAGACUCCUACGGG  
 2. -----G-----  
 3. -----  
 4. -----  
 5. -----  
 6. -----G-----  
 7. -----  
 8. -----C-G-----C-----U-----A-----  
 9. -----A--AA-----G-----  
 10. -----G--U--CU-----  
 11. -----  
 12. -----G--A--CU-----G-----  
 13. -----n-----G-----C-----  
 14. -----C-G-----n--C-----A-CG--A-----U-----A-----  
 15. -----C-G-----C-----A-CG--A-----U-----A-----  
 16. -----C-G-----n--C-----A-CG--A-----U-----A-----  
 17. -----C-G-----n--C-----A-UG--A-----U-----A-----  
 18. -----C-G-----C-----A-G--A-----U-----A-----  
 19. -----C-G-----n--C-----A-nG--A-----U-----A-----  
 20. -----C-G-----C-----A-G--A-----U-----A-----  
 21. -----C-G-----C-----A-G--A-----U-----A-----  
 22. -----C-G-----C-----A-CG--A-----U-----A-----  
 23. -----C-G-----C-----A-G--A-----U-----A-----  
 24. -----C-G-----C-----A-UG--A-----U-----A-----  
 25. -----C-G-----C-----A-G--A-----U-----A-----  
 26. -----C-G-----C-----A-G--A-----U-----A-----  
 27. -----U-----G--A-A-----

1. AGGCAGCAGUAGGAAUCUUCGCGAAUGGACGAAAGUCUGACGGACCAACGCGGUGAGUGAUGAAGGUUUUCGGAUCGUAAG • CUGUGUUA  
 2. -----ACU-----C-  
 3. -----ACU-----A-C-  
 4. -----C-----G-----ACU-----  
 5. -----C-----G-----ACU-----  
 6. -----G-----G-----C-----C-----C-----CC-----G-----CU-----  
 7. -----C-----C-----C-----C-----ACU-----  
 8. -----A-----CC-----G-----ACU-----CCG  
 9. -----ACU-----  
 10. -----A-----U-----U-----C-----A-----CU-----A-  
 11. -----A-----G-----C-----U-----A-----U-----ACU-----A-  
 12. -----G-----C-----CU-----CC-  
 13. -----U-----A-----U-----AC-----C-----G-----UU-----  
 14. -----A-----U-----C-----A-----CU-----CCG  
 15. -----A-----U-----C-----A-----CU-----CCG  
 16. -----A-----U-----C-----A-----CU-----CCG  
 17. -----A-----U-----C-----A-----CU-----CCG  
 18. -----A-----U-----C-----A-----CU-----CCG  
 19. -----A-----U-----C-----A-----CU-----CCG  
 20. -----A-----U-----C-----A-----CU-----CCG  
 21. -----A-----U-----C-----A-----CU-----CCG  
 22. -----A-----U-----C-----A-----CU-----C-G  
 23. -----A-----U-----C-----A-----CU-----C-G  
 24. -----A-----U-----C-----A-----CU-----C-G  
 25. -----A-----U-----C-----A-----CU-----C-G  
 26. -----A-----U-----C-----A-----CU-----C-G  
 27. -----CU-----

1. GGGAAACAAGUACCGUUCGAAACAGGGCGGUACCUUGACGGUACCUAACCAGAAAGCCAGCGGCUAACUACGUGCCAGCAGCGCGGUAAUACGUA  
 2. -----GAGU--U-C-----G-----  
 3. -----U--GAGU--U-C-----G-----  
 4. -----G-UAG-U--U-A-CU-C-----  
 5. -----G-UAG-U--U-A-CU-C-----  
 6. -----AG-U--U-A-CU-----G-----  
 7. -----AAGAGU--U-CUU-----  
 8. -----G-----CG-----CGG-----  
 9. -----G-A-----U--UU-C-----C-----  
 10. -----C--G-GAGU--U-C-C-G-A-----U-UU-----  
 11. -----A-AGU--U--U-----U-UU-----  
 12. -----GUC-UGUAGAGU--U-CUACA-GAG-----G-GA-----C-----  
 13. -----AC--G-UA-UA--U-A-UA-C-----  
 14. -A-----G--G--AGAG--AU-CU--G-UG-----U-CGG  
 15. -A-----G--G--AGAG--AU-CU--G-UG-----U-CGG  
 16. -A-----G--G--AGAG--AU-CU--G-UG-----U-CGG  
 17. -A-----GU-CGGGAGAG--AU-CUCU-G-AG-----U-CGG  
 18. -A-----GU-C-GGAGAG--AU-CUCU-G-AG-----U-CGG  
 19. -A-----UG--UGAGAG--AU-CUU--UG-----U-CGG  
 20. -A-----UG--UGAGAG--AU-CUU--UG-----U-CGG  
 21. -A-----UG--UGAGAG--AU-CUU--UG-----U-CGG  
 22. -A-----G--G-UAGAG--AU-CUA-G-UG-----U-C-G  
 23. -A-----G--G-GAGAG--AU-CUC--UG-----U-C-G  
 24. -A-----G--G-GAGAG--AU-CUC--UG-----U-C-G  
 25. -A-----G--G-GAGAG--AU-CUC--UG-----U-C-G  
 26. -A-----G--G-GAGAG--AU-CUC--UG-----U-C-G  
 27. -A-----U-G--U-A-AG--AU-AU--UG-----U-----

1. GGUGGCAAGCGUUUCCGGAAUUAUUGGGGUAAGGGCUCGCAGGCGGUUUCUAAAGUCUGAUGUAAAGCCCCGGUCUACCCGGGGAGGGUCA  
 2. -----G-----C-G-----C-----  
 3. -----G-----C-G-----A-----U-A-----  
 4. -----A-----C-G-U-----A-----U-----  
 5. -----A-----C-G-U-----A-----U-----  
 6. -G-A-----C-G-----C-----U-U-G-----C-AGC--C--  
 7. -----A-----C-G-----A-----U-----  
 8. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----AAGC--  
 9. -G-----G-----C-G-----CCU-----A-----U-----U-----C--  
 10. -----G-----C-G-----CU-----A-----U-----  
 11. -----G-----C-G-U-----A-----U-----  
 12. -G-----G-----C-G-----C-CU-----G--UU-U-GA-----UUC--UCG--  
 13. -----G-----C-G-----U-C-AUG-----U-----GA-----UC--UUCG--  
 14. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-A--  
 15. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-A--  
 16. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-A--  
 17. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-C--  
 18. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-C--  
 19. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-U--  
 20. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-U--  
 21. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-U--  
 22. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-C--  
 23. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-C--  
 24. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-C--  
 25. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-C--  
 26. -----G-----C-G-----C-----U-UUG-----CAA-C--  
 27. -----G-----C-G-----A-----U-----

1. UUGGAAACUGGGGAAUCUUGAGUCAGAAGAGGAGUGGAAUCCACGUUGAGCGGUGAAAUGCUGAGAGAUGGGAGGAACACCAGUGGCGAAG  
 2. -----A-----  
 3. -----AG-----A-C-----  
 4. -----AG-----A-----U-----A-----  
 5. -----AG-----A-----U-----A-----  
 6. -----AG-----A-C-----  
 7. -----A-A-C-----  
 8. -----AGG-----  
 9. -----G-----A-----  
 10. -----A-----A-----A-C-----  
 11. -----AG-----U-----A-----U-----  
 12. C-----G-----  
 13. -----U-U-G-----G-----A-----U-----  
 14. -----G-----A-----U-----  
 15. -----G-----A-----U-----  
 16. -----G-----A-----U-----  
 17. -----A-G-----A-----A-----U-----U-----  
 18. -----A-G-----A-----A-----U-----U-----  
 19. -----A-G-----A-----A-----U-----U-----  
 20. -----A-G-----A-----A-----U-----U-----  
 21. -----A-G-----A-----A-----U-----U-----  
 22. -----A-G-----A-----A-----U-----U-----  
 23. -----A-G-----A-----A-----U-----U-----  
 24. -----A-G-----A-----A-----U-----U-----  
 25. -----A-G-----A-----A-----U-----U-----  
 26. -----A-G-----A-----A-----U-----U-----  
 27. -----A-----A-----A-----U-----

1. GCGACUCUCUGGUCUGUAACUGACGUCGAGGAGCGAAAGCCUGGGGAGCGAACAGGAUUAAGAUACCCUGGUAGUCCACGCCGUAAACGAUGAGUGC  
 2. -----U-----C-----A-----  
 3. --G--U-----C-----  
 4. -----U-----A-----C-----A-----  
 5. -----U-----A-----C-----A-----  
 6. --G--U-----C-----A-----C-----A-----U-----  
 7. --G--U--U-----C-----A-----  
 8. --G-----C-----A-----  
 9. -----U-----U-----  
 10. --G--U-----C-----A-----  
 11. -----A-----A-----C-----A-----  
 12. -----G-----C-----A-----A-----  
 13. -----U-----C-----A-----C-----A-----  
 14. --G-----U-----U-----A-----A-----U-----A-----  
 15. --G-----U-----U-----A-----A-----U-----A-----  
 16. --G-----U-----U-----A-----A-----U-----A-----  
 17. --G-----C-----A-----A-----A-----  
 18. --G-----C-----A-----A-----A-----  
 19. --G-----C-----A-----A-----A-----  
 20. --G-----C-----A-----A-----A-----  
 21. --G-----C-----A-----A-----A-----  
 22. --G-----C-----A-----A-----A-----  
 23. --G-----C-----A-----A-----A-----  
 24. --G-----C-----A-----A-----A-----  
 25. --G-----C-----A-----A-----A-----  
 26. --G-----C-----A-----A-----A-----  
 27. --G-----C-----A-----A-----A-----

1. UAAGUGUUAAGGGGG·UUUCCGCCUUAGUGUCGAGCUAACGCAUUGAGCACUCGCGCCUGGGGAGUACGGUCGCAAGACUGAAACUCAAAGGAAUU  
 2. -----A-----U-----A-----A-----G-----  
 3. -----A-----U-----U-----A-----C-----G-----  
 4. -----A-----U-----A-U-----A-----C-----G-----  
 5. -----A-----U-----A-U-----A-----C-----G-----  
 6. -----A-----U-----A-U-----A-----C-----G-----  
 7. -----A-----U-----A-----A-----  
 8. -----A-----U-----A-----A-----C-----G-----  
 9. --G-----A-U-----A-----A-----  
 10. -----A-----A-----C-----G-----  
 11. -----A-----  
 12. --G-----U--CGAUA---G---C-A-U---A---A---U---  
 13. --G-----U---CAAUA-----C-----A-A-----C-----G-----  
 14. --G-----G-CCA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 15. --G-----G-CCA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 16. --G-----G-CCA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 17. --G-----CCA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 18. --G-----CCA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 19. --G-----CCA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 20. --G-----CCA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 21. --G-----CCA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 22. --G-----CA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 23. --G-----CCA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 24. --G-----C·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 25. --G-----CCA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 26. --G-----CA·A---A-U---A---A-U---AC---GU---  
 27. --G-----CCA·A---A-U---A---A---AC---GU---



1000

1. GACGGGGCCCGCACAAAGGGUGGAGCAUGUGUUAAUUCGAAGCAACGCGAAGAACCUCUAGGUCUUGACADC·CU·CUGACAAUCCUAGAG  
 2. -----C-----UC-----C-----  
 3. -----C-----C-----C-----  
 4. -----C-----A-----C-----  
 5. -----C-----A-----C-----  
 6. -----C-----C-----C-----  
 7. -----C-----C-----CU-----  
 8. -----C-----CUC---G-----  
 9. -----A-----C-----GCC-----  
 10. -----A-----C-----CA-----CGGUG-----  
 11. -----C-----C-G-U---C-CUG-----  
 12. -----A-----A-----U-----C-----C-----CGGU-----  
 13. -----C-----CA-----CGCU-----  
 14. -----A-----C-----Gn-----  
 15. -----A-----C-----GU-----  
 16. -----A-----C-----GU-----  
 17. -----A-----C-----GU-----  
 18. -----A-----C-----GU-----  
 19. -----A-----C-----Gn-----  
 20. -----A-----C-----Gn-----  
 21. -----A-----C-----GU-----  
 22. -----A-----C-----G-----  
 23. -----A-----C-----G-----  
 24. -----A-----C-----G-----  
 25. -----A-----C-----G-----  
 26. -----A-----C-----G-----  
 27. -----A-----C-----G-----

1100

1. AUAGGACGU·CCCUCGCGGG·CAG·AG·UGACAGGUGGUGCAUGGUUGUCGUCAGCUCGUGUGAGAGUUGGGUUAAGUCCCGCAACGAGC  
 2. ---G--U-----GA---GA-----  
 3. ---GAC-U-----GA-----  
 4. ---G-U-U-U-----AG-----  
 5. ---G-U--U-----AG-----  
 6. ---G-U-----G-----  
 7. ---AG--U-----GA-----  
 8. -C--G---UU-----GA-----  
 9. ---GA--U-----A-----  
 10. ---C-C-U--U-----A--UG-----  
 11. ---U-GUU--U-----A--A-C-G-----  
 12. ---C--UU-----A-----GA-----  
 13. ---AG--U-----UG-----  
 14. ---C--U-----GA-----  
 15. ---C--U-----GA-----  
 16. ---C--U-----GA-----  
 17. ---C--U-----GA-----  
 18. ---C--U-----GA-----  
 19. ---C--U-----GA-----  
 20. ---C--U-----GA-----  
 21. ---C--U-----GA-----  
 22. ---C--U-----GA-----  
 23. ---C--U-----GA-----  
 24. ---C--U-----GA-----  
 25. ---C--U-----GA-----  
 26. ---C--U-----GA-----  
 27. ---C--U-----GA-----

1. GCAACCCUUGAUCUAGUUGCCAGCA · UUCAGUUGGGCACUCUAAGGUGACUGCCGGUGACAAACCGGAGGAAGUGGGGAUGACGUCAAAUCAU  
 2. -----  
 3. -----A-C-----  
 4. -----U-----A-----  
 5. -----U-----A-----  
 6. -----  
 7. -----U-----  
 8. -----C-----G-----  
 9. -----U-----  
 10. -----U-----  
 11. -----U-----U-----  
 12. -----AUG-----GG-CA-C-----CA-----  
 13. -----AUCU-----GA-A-----UC-----GA-----C-----  
 14. -----A-----  
 15. -----A-----  
 16. -----A-----  
 17. -----  
 18. -----  
 19. -----  
 20. -----  
 21. -----  
 22. -----U-----  
 23. -----  
 24. -----  
 25. -----  
 26. -----  
 27. -----

1. CAUGCCCUUAUGACUUGGGCUACACACGUGCUACAAUGGACAGAACAAAGGG · CAGCGA · ACCGCGAGGUUAAGCCAAUCCCA · CAAAUCUGU  
 2. -----C-----UG-U-----U-A-G-----G-----U--A-CA--  
 3. -----C-----UG-U-----UU-A-G-----U--U--A-CA--  
 4. -----C-----G-U-----A-U-A-G-----GG--U--U--U--A-C--  
 5. -----C-----G-U-----A-U-A-G-----GG--U--U--U--A-C--  
 6. -----C-----U-----UU-AG-----CG--U--U--A--A--  
 7. -----C-----UG-U-----U-A-G-----C-----U--A-CA--  
 8. -----C-----UG-U-----U--G-----G--A-CA--  
 9. -----C-----UG-----AG-----CC--A-----U--A-CA--  
 10. -----C-----UGAU--G--UU-C-AC-----GGG-----U--AUC--  
 11. -----C-----GAU--C--UU-C-ACU-----AGGG--U--G--U--GUC--  
 12. -----C-----A-----C-G-U--C--AAG--AGGA--UC-GG-----U-GA--G-C-G--  
 13. -----C-----UUG-U--C--AU-U-CUU-----AAG-U--U--U-U--A-CAA--  
 14. -----UC-----G-G-U-----A--A--C-----U--G-C-CC  
 15. -----UC-----G-G-U-----A--A--C--G-----U--G-C-CC  
 16. -----UC-----G-G-U-----A--A--C-----U--G-C-CC  
 17. -----UC-----GUG-U-----A-----CG--U-----U--G-CACC  
 18. -----UC-----GUG-U-----A-----CG--U-----U--G-CACC  
 19. -----UC-----GUG-U-----A-----C--G-----U--G-CACC  
 20. -----UC-----GUG-U-----A-----C--G-----U--G-CACC  
 21. -----UC-----GUG-U-----A-----C--U-----U--G-CACC  
 22. -----UC-----GUG-U-----A-----CG--U-----U--G-CACC  
 23. -----UC-----GUG-U-----A-----CG--U-----U--G-CACC  
 24. -----UC-----GUG-U-----A-----CG--U-----U--G-CACC  
 25. -----UC-----GUG-U-----A-----CG--U-----U--G-CACC  
 26. -----UC-----GUG-U-----A-----CG--U-----U--G-CACC  
 27. -----C-----UG-U-----AG-----CCG-----U--G-CA--

1300

1. CUCAGUUCGGAUCCGAGUCUGCAACUCGACUCGUGAAGCUGGAUCGUAAGUAAUCGCGGAUCAGCAUGCCCGGUGAAUACGUUCCCGGGCCUU  
 2. -----U--G-----C--A--C-----  
 3. -----U--G-----C--A--C-----U-----A-----  
 4. -----U-U-G-----C-A-A-----  
 5. -----U-U-G-----C-A-A-----  
 6. -----U-U-G-----C-A-A-----  
 7. -----U-U-G-----C-A-A-----  
 8. -C-----U--G-----C-C--A--C-----  
 9. -----U--G-----C--A--C-----U-----  
 10. -C-----U-G-G-----C-C-A--U-----U-----A-----U-----  
 11. -----U-U-G-----C-A-A--U-----  
 12. -----U-U-G-----C-A-A--UC--U-----U-----  
 13. -----U-U-G-----C-A-A--UC-----  
 14. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 15. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 16. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 17. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 18. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 19. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 20. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 21. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 22. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 23. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 24. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 25. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 26. -C-----U--G-----C--A--C--U-----C-----  
 27. -----U--G-----C--A--C--U-----C-----

1400

1. GUACACACCGCCCGUCACACCAGAGAUUUGUAAACCCCGAAGUCGGUGAGGUAACCUUUUAGGAGCCAGCCCGGAAGGGGACAGAUGAUUG  
 2. -----G-----U-----  
 3. -----G--CAUC-ACG-----  
 4. -----G--U-----U-----  
 5. -----G--U-----U-----  
 6. -----G-----U-----  
 7. -----GA--G·A--CGU--U-----  
 8. -----An-----  
 9. -----G-----UA-----  
 10. -----G--CAUC-ACG-----  
 11. -----U-----  
 12. -----AC-----G·CA-----GU-----  
 13. -----G--C-----G·A-----GU--A-C-----  
 14. -----U-G--AU--C-----A-----  
 15. -----U-G--AU--C-----A-----  
 16. -----U-G--AU--C-----A-----  
 17. -----C-AG--AU--CU-----A-----  
 18. -----C-AG--AU--CU-----A-----  
 19. -----C-AG--AU--GCU-----  
 20. -----C-AG--AU--GCU-----  
 21. -----C-AG--AU--GCU-----  
 22. -----C-AG--AU--CU-----A-----  
 23. -----C-AG--AU--CU-----A-----  
 24. -----C-AG--AU--CU-----A-----  
 25. -----C-AG--AU--CU-----A-----  
 26. -----C-AG--AU--CU-----A-----  
 27. -----C-AG--AU--CU-----A-----



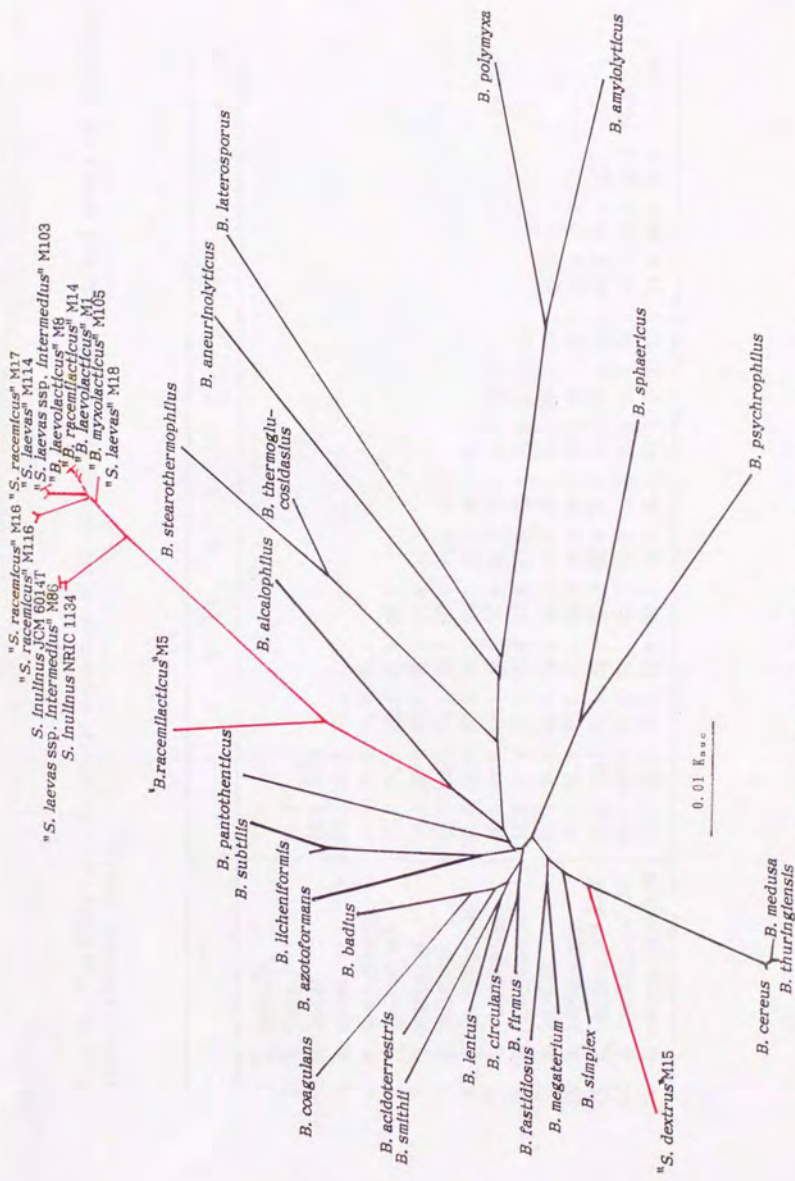


Fig. 2-2. Evolutionary distance tree of spore-bearing lactic acid bacteria and *Bacillus* species.

Table 2-1. Similarity values for a 1,446-nucleotides of 16S rRNAs of spore-bearing lactic acid bacteria and representatives of the genus *Bacillus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. <i>B. subtilis</i>															
2. <i>B. firmus</i>	95.3														
3. <i>B. lentus</i>	93.8	96.6													
4. <i>B. cereus</i>	94.5	94.7	94.1												
5. <i>B. thuringiensis</i>	94.4	94.6	94.0	99.9											
6. * <i>S. dextrus</i> * M15	93.6	94.1	94.1	95.6	95.5										
7. <i>B. megaterium</i>	94.1	96.0	95.4	95.3	95.4	94.3									
8. <i>B. coagulans</i>	94.1	94.7	94.4	93.8	93.7	93.4	93.6								
9. <i>B. pantothenicus</i>	94.0	94.0	93.4	93.2	93.2	92.8	93.7	92.8							
10. <i>B. psychrophilus</i>	91.8	93.5	93.8	92.0	91.9	91.1	92.5	91.7	91.1						
11. <i>B. sphaericus</i>	92.5	93.4	92.9	93.6	93.6	91.9	93.4	91.6	91.8	93.7					
12. <i>B. polymyxa</i>	89.1	89.6	89.3	89.3	89.4	88.8	89.5	89.0	90.0	89.1	89.1				
13. <i>B. laterosporus</i>	89.7	90.9	90.0	90.7	90.7	90.2	90.9	90.0	89.7	88.7	89.6	89.2			
14. <i>S. inulinus</i> JCM 6014	91.6	92.3	91.8	91.1	91.0	90.9	91.7	92.9	90.5	90.1	88.9	89.1	88.1		
15. * <i>B. laevolacticus</i> * M8	91.3	91.9	91.4	91.1	91.1	90.9	91.5	92.5	90.0	90.2	89.1	88.4	88.4	97.9	
16. * <i>B. racemilacticus</i> * M5	94.0	94.6	93.6	92.9	92.8	92.5	93.4	92.3	93.3	91.3	91.6	89.3	89.8	94.7	94.7

Table 2-2. Similarity values and numbers of nucleotide differences for a 1,474-nucleotides of 16S rDNAs of spore-bearing lactic acid bacteria cluster B-1c. The values on the upper right are percentages of similarity, and the values on the lower left are numbers of nucleotide differences.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>S. inulinus</i> JCM 6014		99.9	100.0	97.5	97.4	97.2	97.3	97.3	97.8	97.8	97.5	97.8	97.6
2. <i>S. inulinus</i> NRIC 1134	1		99.9	97.5	97.4	97.2	97.4	97.3	97.8	97.8	97.5	97.8	97.6
3. <i>S. laevas</i> ssp. <u>intermedius</u> * M86	0	1		97.5	97.4	97.2	97.3	97.3	97.8	97.8	97.5	97.8	97.6
4. <i>S. racemicus</i> * M16	37	37	37		99.9	98.4	98.5	98.6	98.7	98.9	98.6	98.9	98.6
5. <i>S. racemicus</i> * M116	38	38	38	1		98.4	98.6	98.6	98.8	98.8	98.6	98.8	98.6
6. <i>S. laevas</i> ssp. <u>intermedius</u> * M103	42	41	42	24	23		99.9	99.8	98.2	98.4	98.4	98.4	98.4
7. <i>S. laevas</i> * M114	40	39	40	22	21	2		99.9	98.2	98.6	98.4	98.6	98.4
8. <i>S. racemicus</i> * M17	40	40	40	21	20	3	1		98.3	98.6	98.4	98.6	98.4
9. <i>S. laevas</i> * M18	32	32	32	19	20	27	26	25		99.0	98.9	99.0	99.0
10. <i>B. laevolacticus</i> * M8	33	33	33	16	17	23	21	20	15		99.7	100.0	99.7
11. <i>B. laevolacticus</i> * M1	37	37	37	20	21	24	24	23	16	4		99.7	99.9
12. <i>B. racemilacticus</i> * M14	33	33	33	16	17	23	21	20	15	0	4		99.7
13. <i>B. myxolacticus</i> * M105	35	35	35	20	21	24	24	23	14	4	2	4	

Table 2-3. GC contents of chromosomal DNA of spore-bearing lactic acid bacteria.

Bacterial strain	GC content (mol%)
<i>S. inulinus</i> JCM 6014 <sup>T</sup>	46.6
<i>S. inulinus</i> NRIC 1134	45.4
* <i>S. racemicus</i> * M16	42.9
* <i>S. laevas</i> * M114	45.4
* <i>S. racemicus</i> * M17	42.7
* <i>S. laevas</i> * M18	42.9
* <i>B. laevolacticus</i> * M8	42.1
* <i>B. laevolacticus</i> * M1	43.4
* <i>B. myxolacticus</i> * M105	42.5
* <i>B. racemilacticus</i> * M5	37.3
* <i>S. dextrus</i> * M15	39.4



Table 2-4. DNA-DNA hybridization among spore-bearing lactic acid bacteria.

Source of unlabeled DNA	Reassociation (%) with labeled DNA from:	
	<u>S. inulinus</u>	<u>B. laevolacticus</u> *
	JCM 6014 <sup>T</sup>	M8
<u>S. inulinus</u> JCM 6014 <sup>T</sup>	100	27
<u>S. inulinus</u> NRIC 1134	91	
* <u>S. racemicus</u> * M16	35	
* <u>S. laevas</u> * M114	36	
* <u>S. racemicus</u> * M17	24	
* <u>S. laevas</u> * M18	33	
* <u>B. laevolacticus</u> * M8	24	100
* <u>B. laevolacticus</u> * M1	24	93
* <u>B. myxolacticus</u> * M105	34	84
* <u>B. racemilacticus</u> * M5	7	9

### 第 3 章 考 察

#### 第 1 節 16S rDNA塩基配列に基づいた系統関係

本研究において、供試した *Bacillus* 属細菌基準株 11 種 11 株は、16S rDNA の塩基配列に基づいて、系統的に 5 つのグループに分かれた。それは Ash et al. (1991b) が、*Bacillus* 属 51 種の 16SrRNA の塩基配列を決定し、これに基づいて *Bacillus* 属は系統的に 5 つのグループに分かれると報告したこと、同様の結果となった。

有胞子乳酸菌は 2 つのブランチ (B-1, B-2) に分かれた。B-1 ブランチは、Ash et al. (1991b) の報告の中で ungrouped ブランチとしていた *S. inulinus*、カタラーゼ陰性の有胞子乳酸菌、及び陽性の有胞子乳酸菌により構成される、系統的にまとまったグループであり、*Bacillus* 属の系統的な広がりの中で他の *Bacillus* 属細菌とは独立して位置した。B-2 ブランチは、"*S. dextrus*" M15 1 株であり、*B. cereus* - *B. megaterium* クラスタの中位置しており、系統的に B-1 ブランチとかなり離れていた。

本研究における系統図では、*S. inulinus* のブランチと *B. alcalophilus* のブランチが同一の系統枝の、根元のところで枝分かれをしているが、両菌種の進化距離はかなり遠く離れている。系統図におけるブランチングパターンは用いた菌株の種類 (すなわち 16S rDNA 塩基配列の類似性)、及び数により同じ系統図作成方法でも異なったトポロジーを示すことがある。例えば、ここに株 A と株 B は進化距離が互いに遠く離れているが、その系統枝の分岐点が近接している時、A に近縁な株をさらに加えて再び系統樹を作成すると、B が A 群の系

統枝の途中から分枝することがある。しかし、AとBとの進化距離は株を増やしても同じであるから遠いことには変わらない。さらにBと近縁な株を加えてまた系統図を作成したならば、A群とB群とは再び枝分かれの根元を別にする。従って、系統的解析に基づいて供試菌株がどのように分類群を構成しているかを論ずるときには、系統図のブランチングパターンによるトポロジーだけではなく、常に塩基配列のs値(similarity value)を考慮する必要がある。以上のことから、Ash et al.(1991)の報告と同様にB. alcalophilusと、S. inulinusとは別系統の分類群である。すなわち、有孢子乳酸菌のB-1ブランチはBacillus属細菌の他のグループと同じく、16S rDNA塩基配列のs値から判断して系統的に属レベルで独立しているグループである。

このB-1ブランチにはカタラーゼ陰性(Sporolactobacillus spp.)、及び陽性(Bacillus spp.)の株が含まれている。カタラーゼ活性は分類学上、特に乳酸菌においては重要な分類指標である。しかし、本研究の結果から、カタラーゼ活性は、属の分類指標としては重要ではないことが示めされた。なお、カタラーゼの活性が消失している例は、Bacillus属細菌の中にもみられ、B. azotoformans(脱窒能を有する)、B. larvae、B. lentimorbus、B. popilliae(以上、昆虫病原菌)はカタラーゼ陰性である(Claus & Berkeley, 1986)。また、B-2ブランチであるカタラーゼ陰性の\*S. dextrus\* M15は、Bacillus属のグループ1に位置している。従って、Sporolactobacillus属を定義している分類学的性質よりカタラーゼ陰性を削除し、カタラーゼ陽性株(Bacillus spp.)をSporolactobacillus属に移すべきである。これについては第2節で述べる。

\*B. racemilacticus\* M5はB-1ブランチの中でB-1cクラスターとはやや離れていたが、B-1cとの16S rDNA塩基配列のs値は94.7%と比較的高い値を示した。他のグラム陽性細菌の分類群の同じ属内での16S rDNA塩基配列のs値は、94~95%である(Collins et al., 1989; Collins et al., 1990; Martinez-Marcia & Collins, 1990; Martinez-Marcia & Collins, 1991a; Martinez-

Marcia & Collins, 1991b; Whiley et al., 1990; Williams et al., 1989; Williams & Collins, 1990; Williams et al., 1990)ので、B-1ブランチの系統的なまとまりは1つの属(*Sporolactobacillus*属)として位置づけられるものである。

B-2ブランチであるカタラーゼ陰性の '*S. dextrus*' M15は、*Bacillus*属の *B. cereus*と*B. megaterium*との間に位置し、これらの菌種とクラスターを形成した。このクラスターに属している*B. cereus*、*B. fastidiosus*、*B. medusa*、*B. megaterium*、*B. simplex*、及び*B. thuringiensis*はその栄養細胞の幅が1.0  $\mu$ m以上ある細胞の幅の大きい菌群である (Claus & Berkeley, 1986)。そこで、'*S. dextrus*' M15 も大きな細胞であるかを調べるために、細胞を酢酸ウラニルで陰染色して電子顕微鏡で観察をしたところ、対照に用いた *B. cereus*、*B. megaterium* よりもかなり細く、*B. subtilis*の細胞の幅と同程度であった。このブランチの他の種では、細胞の幅と系統的なまとまりの形成とは対応している。'*S. dextrus*' M15においてはこのような対応関係は認められなかった。

'*S. dextrus*' M15は B-1ブランチの有孢子乳酸菌とも、また同じくホモ乳酸発酵を行いL(+)乳酸を生成する*B. coagulans*とも系統的に離れて位置している。この菌種は*Sporolactobacillus*属ではなく、現時点では、*Bacillus*属の新種として取り扱うのが妥当であると考えられる。前述したように、*Bacillus*属細菌の複数の箇所でカタラーゼが欠失した菌種が認められる。このことより、有孢子乳酸菌は、本来は他の好気性*Bacillus*と同じく好氣的代謝機能を持っていたが、進化(退行進化)の過程でこれを欠失し、いわば'乳酸菌化'したと考えられる。そして、その'乳酸菌化'は、*B. coagulans*を含めて*Bacillus*の系統の中で複数の箇所で独立に起こったものと考えられる。

有孢子乳酸菌のB-1cクラスターは、系統的に5つのサブグループに分けられ、それぞれは種のレベルで離れていることが示唆された。同じサブグループに位置している菌株どうしの16S rDNA塩基配列の塩基の相違数は0~4bであっ

た。グラム陽性乳酸菌(low GC group)で同一種の塩基の相違数は *Lactococcus lactis* で0~2塩基(Collins et al., 1989)、*Streptococcus parasanguis* で0~6塩基(Whiley et al., 1990)であった。これらの例は、B-1cクラスターの各サブグループはそれぞれ別個の種を構成している可能性を示唆している。つまり、B-1cクラスターは5つの菌種から形成されている可能性が大きい。この確認については、各サブグループの菌株をreferenceとしてDNA-DNA相同性を調べる必要がある。

Yanagida et al. (1987b)は *Sporolactobacillus* 属をDNA相同値から5つのグループに分けたが、そのグループ2とグループ4に属する '*S. laevas* ssp. *intermedius*' M103、'*S. laevas*' M114、'*S. racemicus*' M17 の3株は本研究におけるSG-3に属した。Yanagida et al. (1987b) はグループ2の株とグループ4の株との間のDNA相同値は約60%であったと報告している。従って、本研究、及び Yanagida et al. (1987b)の結果をふまえると、これらグループ2、4は一つのグループとしてまとめることができる。そのほかグループ1、3、5は本研究のSG-1、SG-2、SG-4とほぼ一致した。しかし、カタラーゼ陽性の有孢子乳酸菌については Yanagida et al. (1987b)のグルーピングは本研究のグルーピングとは異なっていた。

SG-3、及びSG-5には、それぞれD(-)乳酸を生成する菌株と、DL乳酸を生成する菌株とが含まれている。乳酸菌の分類における生成乳酸の旋光性の違いは、重要な分類指標の1つであるが、本研究の結果から中温性有孢子乳酸菌におけるその分類指標としての重要性は疑わしいものであることが示された。すなわち、SG-3、及びSG-5は前述したとおり、それぞれ単一の種として系統的にまとまっているからである。さらに、旋光性が同じであると16S rDNA塩基配列の塩基の相違数が少ない、ということも見られなかった。例えば、SG-5において同じくD(-)乳酸を生成するM8とM1とは4bの相違があったにも係わらず、DL乳酸を生成するM14とは、M8が0b、M1が4bの相違となっていた。

## 第2節 染色体DNAのGC含量、及び相同性

B-1cクラスターの菌株のGC含量は 42.1~46.6 mol%と比較的まとまった値を示したが、同じB-1ブランチである '*B. racemilacticus*' M5は37.3 mol%と1株だけ低い値となった。この遺伝的異質性は DNA相同性によっても示された。すなわち、*S. inulinus* JCM 6014<sup>T</sup>とは7%、'*B. laevolacticus*' M8とは9%の相同値でしかなかった。この菌株がB-1cクラスターと同じ属であるかどうかの評価はこの値では判断できない。それを判断する手段としては16S rDNA塩基配列の比較による方法が有効で、前節において、この菌株はB-1cと同じ属に含めるのが妥当であることが示唆された。

B-2ブランチである '*S. dextrus*' M15のGC含量は39.4 mol%であった。この菌株は系統的には *B. cereus* - *B. megaterium* クラスターに位置したが、このクラスターに位置している菌種のGC含量は33~37 mol% (Fahmy et al., 1985) で、'*S. dextrus*' M15はこれらよりもやや高い値であった。

B-1cクラスターのDNA相同値は24%以上であった。この値は、他の細菌の場合においても、同一属内の種間の値であり、B-1cは遺伝的にほぼ均質な属としてのまとまりを成していることを示めている。

DNA相同値は SG-1サブグループ内では91%、SG-5サブグループ内では84%以上と極めて遺伝的均質性が高いまとまりを成していることが示された。さらに、SG-1 サブグループでDNA相同性実験に供試しなかった '*S. laevis* ssp. *intermedius*' M86 の16S rDNA塩基配列は *S. inulinus* JCM 6014<sup>T</sup>と同一であり、*S. inulinus* NRIC 1134では *S. inulinus* JCM 6014<sup>T</sup> とはDNA相同値が91%であり塩

基の相違数1bであった。*'S. laevas ssp. intermedius'* M86を含めてこのサブグループは種としてまとめることが出来る。SG-5サブグループにおいても DNA 相同性実験に供試しなかった*'B. racemilacticus'* M14の16S rDNA 塩基配列が*'B. laevolacticus'* M8 と同一であることから、SG-5も同一種としてまとめられる。

B-1c の 5つのサブブランチは、DNA 相同値、及びサブブランチ内の 16S rDNA塩基配列のs値を基にして、それぞれ別個の種を構成していると考えられる。この内カタラーゼ陽性株からなるサブブランチはこれによって他と識別できる。Yanagida et al. (1987a) は、これら菌株を含む有孢子乳酸菌について数値分類を適用しているが、明確なグループ分けはされていない。この研究において用いた表現型の数も多くない。新種としての記載には5つのサブブランチの表現型を十分に調べ、個々のサブブランチの特徴付けを行う必要があり、今後の課題である。

B-1 ブランチのクラスター B-1c の菌株は1つの属に属する。また、*'B. racemilacticus'* M5はこれらと系統的に離れているが、前節で考察したように系統的に同属に含めて矛盾はない。また、表現型はNakayama & Yanoshi (1967 a)、Yanagida et al. (1987a)の記載によれば、B-1c クラスターと同属としてまとめられるものである。従って、*'B. racemilacticus'* M5を含め、次の*Sporolactobacillus*の属のemendation (分類学的限界の変更)を提案する。表現型については Kitahara & Suzuki (1963), Nakayama & Yanoshi (1967a), Nakayama & Yanoshi (1967b), Uchida & Mogi (1973), Collins & Jones (1979), Yanagida et al. (1987a)に基づいている。

Emended description of *Sporolactobacillus* Kitahara and Suzuki 1963.

Gram-positive rod. Motile with peritrichous flagella. Endospores

formed. Microaerophilic. Mesophilic. Catalase positive or negative. Homo-lactic fermentation producing D(-), D+DL, or DL-lactic acid. The cellure fatty acids consist of large amounts of C<sub>15</sub>- and C<sub>17</sub>-. The major quinone is menaquinone-7. The DNA base composition ranges from 37 to 47 GC mol%.

The type species is Sporolactobacillus inulinus (Kitahara and Suzuki 1963) Kitahara and Lai 1967.

### 第3節 16S rDNA塩基配列 s 値とDNA相同値との関係

有胞子乳酸菌 B-1cにおける 16S rDNA塩基配列の s 値と染色体 DNAの相同値との関係をTable 3-1、Fig. 3-1に示した。グラフ Fig. 3-1は本研究の結果と、Yanagida et al. (1987b)の DNA相同値を合わせて構成した。

16S rDNA塩基配列の s 値が99.7%以上、塩基の相違数として 4b以下である菌株間では DNA相同値が 84% 以上を示した。16S rDNA 塩基配列の s 値がほとんど一致しているにもかかわらず、DNA相同値が低い場合がある。Fox et al. (1992)は B. psychrophilus と B. globisporus との間の16S rRNA塩基配列の s 値が99.8%であるのに対し、DNA相同値は23%、あるいは50%であった例を報告している。また、Yamagida et al. (1987b)は 'S. racemicus' M17 と 'S. laevis' M114 との間のDNA相同値が61%、'S. racemicus' M116 と 'S. racemicus' M16 との間が 55%、と報告しているが、これらの間の16S rDNA塩基配列の s 値は共に 99.9%であった。Wayne et al. (1987)は細菌の系統分類に関する委員会の報告において系統的定義としては、細菌の種はDNA相同値が約70%以上ある菌株を



含むものであろうと述べている。この系統学的な定義に従うと16S rDNA塩基配列のs値が約99.5%以上を示す菌株は、同一の種に属することが示された。しかしながら、16S rDNA塩基配列のs値が99.5%以上の場合でもそれらが同一種であるとは限らない。

16S rDNA塩基配列のs値が97.3%から97.8%、塩基の相違数として32bから40bである菌株間ではDNA相同値が24%から36%であった。このようなDNA相同値を示す菌株間の関係は、これまでの数多くの研究から別種ではあるが、同一属であるとされている。従って、16S rDNA塩基配列のs値が約97%以上を示す菌株間の関係は、系統的には同属であると考えられる。

Yanagida et al. (1987b)の報告の中でDNA相同値が34%から54%を示した菌株間では、本研究において16S rDNA塩基配列のs値は98.4%から98.6%、塩基の相違数として20bから23bであった。16S rDNA塩基配列のs値が約98.4%以上の菌株間の関係は近縁な別種から亜種の関係であると考えられる。

Wayne et al (1987)の種の系統的な定義はDNA相同値に基づいている。しかし、このDNA相同値には事実上、理論値がなく、あるのはただ用いた株間の相対値でしか過ぎない。従って、比較できるのは同一実験内、あるいはそれに準ずる範囲内のデータである。一方、16S rDNA塩基配列は同一菌株を供試すれば、同一配列の結果となる。従って、研究者間でそのデータがふれることがないので、分類学的な基準には最も良いパラメーターとなりうる。本研究、及びFox et al. (1992)の報告にみられた16S rDNA塩基配列のs値がほとんど一致しているのにDNA相同値が比較的低い(亜種レベル)という菌株間の関係は、進化的にはごく最近になって分かれてきた菌株どうしであるものと推測される。Fox et al. (1992)は遺伝的には近縁であるのでこれらの菌株は'rRNA species complex'または'rRNA super-species'に属しているとみなされるのが最も良いと主張している。これまでは遺伝子型的に比較的よくまとまった属内での16S rDNA塩基配列のs値の報告は、ほとんどない。本研究によって、種レベル、属

レベルでの16S rDNA塩基配列のs値とDNA相同値との関係が示されたが、今後、多くの分類群において16S rDNA塩基配列のs値とDNA相同値との関係についてのデータが蓄積されていけば、"rRNA super-species"レベル以上の種のレベルにおいてDNA相同値とは別の有効な分類学的指標となる可能性が考えられる。

Table 3-1. Comparison between DNA homology values and 16S rDNA similarity values.

Pair of strains	DNA homology value (%)	16S rDNA similarity value (%)	16S rDNA base differences
* <i>B. laevolacticus</i> * M8 , * <i>B. laevolacticus</i> * M1	93	99.7	4
<i>S. inulinus</i> JCM 6014 <sup>T</sup> , <i>S. inulinus</i> NRIC 1134	91	99.9	1
* <i>B. laevolacticus</i> * M8 , * <i>B. myxolacticus</i> * M105	84	99.7	4
<i>S. inulinus</i> JCM 6014 <sup>T</sup> , * <i>S. laevas</i> * M114	36	97.3	40
<i>S. inulinus</i> JCM 6014 <sup>T</sup> , * <i>S. racemicus</i> * M16	35	97.5	37
<i>S. inulinus</i> JCM 6014 <sup>T</sup> , * <i>B. myxolacticus</i> * M105	34	97.6	35
<i>S. inulinus</i> JCM 6014 <sup>T</sup> , * <i>S. laevas</i> * M18	33	97.8	32
* <i>B. laevolacticus</i> * M8 , * <i>S. inulinus</i> JCM 6014 <sup>T</sup>	27	97.8	33
<i>S. inulinus</i> JCM 6014 <sup>T</sup> , * <i>B. laevolacticus</i> * M8	24	97.8	33
<i>S. inulinus</i> JCM 6014 <sup>T</sup> , * <i>S. racemicus</i> * M17	24	97.3	40
<i>S. inulinus</i> JCM 6014 <sup>T</sup> , * <i>B. laevolacticus</i> * M1	24	97.5	37

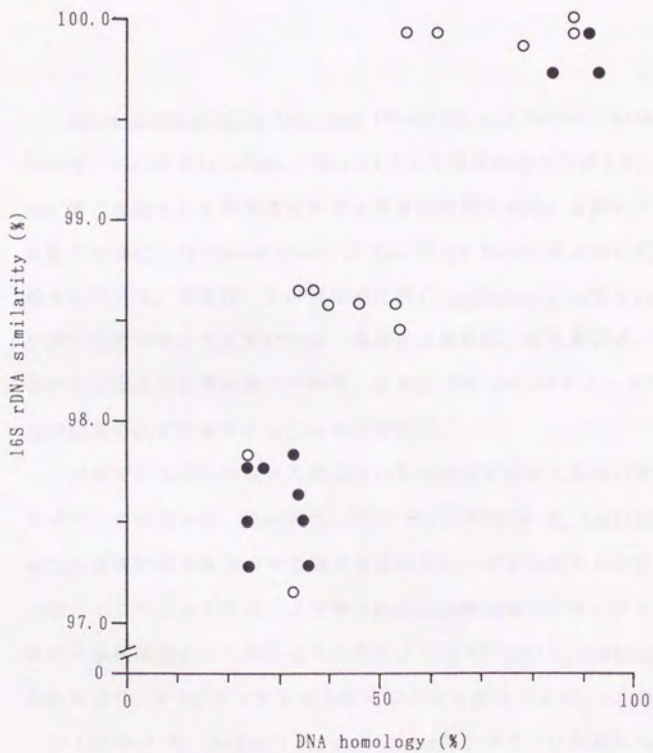


Fig. 3-1. Correlation between DNA homology and 16S rDNA similarity.

○, DNA homology value from Yanagida et al. (1987b).

## 第4章 総括

Sporolactobacillus inulinus (Kitahara and Suzuki) Kitahara and Lai 1967は、1963年にKitahara & Suzukiにより鶏飼料から分離され、Lactobacillus 属の亜属として発表されたホモ発酵乳酸菌である。本菌はその後の北原らの研究を基に、Approved Lists of Bacterial Names には独立した属として収録されている。北原は、この属は進化的に Lactobacillus属と Bacillus属との中間に位置すると考えていたが、菌体脂肪酸組成、細胞壁組成、及びメナキノンタイプなどの化学分類学的研究、さらに 16S rRNAカタローギングにより Bacillus属に近縁な属であることが示された。

本研究により、有孢子乳酸菌は16S rDNA塩基配列に基づいて系統的に2つのブランチに分かれ、その内の一方のブランチB-1は S. inulinusを含み、Bacillus属細菌の系統群の中で第6番目のグループを形成することが明らかになった。そして、このグループは他の Bacillus属細菌のグループとは属レベルで離れた系統関係にあった。もう一方のブランチB-2は 'S. dextrus' M15 1株のみからなり、B-1ブランチとは系統的にかなり離れており、Bacillus 属のグループ1の中の B. cereus - B. megaterium クラスタに位置した。しかし、細胞の幅は細く、B. cereus - B. megaterium クラスタの形態的特徴である細胞の幅が大きいこと、とは異なっていた。この様な S. inulinusを含むB-1ブランチとの系統的な距離の遠さから、本菌は Sporolactobacillus属とは異なり、Bacillus属に新種として移されるべきであると考えられた。

B-1ブランチは、カタラーゼ陰性株 (Sporolactobacillus spp.)、カタラーゼ陽性株 (Bacillus spp.) を含んでいた。しかし、系統的には単一の属、すなわち Sporolactobacillus属としてまとまった分類群を構成した。そこで、カタ

ラーゼ陰性であることをこの属の定義から削除し、属の emendation (分類学的限界の変更)を行った。

B-1ブランチは、系統的にB-1cクラスターと '*B. racemilacticus*' M5 とに分かれた。B-1cはさらに5つのサブグループに分かれた。これらサブグループは、16S rDNA塩基配列の s 値、及び DNA相同値からそれぞれ独立した種を構成すると考えられた。また、同一サブグループ内に生成乳酸の光学活性が異なる株(D, or DL)が存在することが認められた。有胞子乳酸菌においては、乳酸の旋光性の違いにより種が分けられているが、これは分類学的指標にはなり得ないことが示された。

16S rDNA塩基配列の s 値と DNA相同値との関係から、同一種である菌株間の16S rDNA塩基配列の s 値は 99.5%以上(塩基の相違数 7bから 8b以内)であるとの知見が得られた。16S rDNA塩基配列の s 値が 99.5%以上である菌株が同一種に属するとは限らないが、種の系統的定義の一つの基準となり得ることを示した。また、16SrDNA塩基配列の s 値が約97%以上を示す菌株間の関係は、系統的には同属であるとの知見が得られた。今後、種々の分類群において 16S rDNA塩基配列の s 値と DNA相同値との関係のデータが蓄積されていけば、種、あるいは種以上のレベルにおいても、DNA 相同値とは別の有効な分類学的指標となる可能性が示された。

## 参 考 文 献

- Amemiya, Y., and O. Nakayama. 1980. Polysaccharide formation by spore-bearing lactic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 26:159-166.
- Ash, C., J. A. E. Farrow, M. Dorsch, E. Stackebrandt, and M. D. Collins. 1991a. Comparative Analysis of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:343-346.
- Ash, C., J. A. E. Farrow, S. Wallbanks, and M. D. Collins. 1991b. Phylogenetic heterogeneity of the genus Bacillus revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA. *Lett. Appl. Microbiol.* 13:202-206.
- Bonner, J., G. Kung, and I. Bekhor. 1967. A method for the hybridization of nucleic acid molecules at low temperature. *Biochemistry.* 6:3650-3653.
- Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy, and H. F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:4801-4805.
- Claus, D., and R. C. W. Berkeley. 1986. Genus Bacillus, p.1105-1139.

In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.),  
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams  
& Wilkins Co., Baltimore.

Collins, M. D., C. Ash, J. A. E. Farrow, S. Wallbanks, and A. M.  
Williams. 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses  
of lactococci and related taxa. Description of Vagococcus fluvi-  
alis gen. nov., sp. nov. J. Appl. Bacteriol. 67:453-460.

Collins, M. D., and D. Jones. 1979. Isoprenoid quinone composition as  
a guide to the classification of Sporolactobacillus and possible  
related bacteria. J. Appl. Bacteriol. 47:293-297.

Collins, M. D., A. M. Williams, and S. Wallbanks. 1990. The phylogeny  
of Aerococcus and Pediococcus as determined by 16S rRNA sequence  
analysis: description of Tetragenococcus gen. nov. FEMS Microbiol.  
Lett. 70:255-262.

Denhardt, D. T. 1966. A membrane-filter technique for the detection of  
complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23:641-646.

Fahmy, F., J. Flossdorf, and D. Claus. 1985. The DNA base composition  
of the type strains of the genus Bacillus. System. Appl. Microbi-  
ol. 6:60-65.

Farrow, J. A. E., C. Ash, S. Wallbanks, and M. D. Collins. 1992. Phy-



logenetic analysis of the genera Planococcus, Marinococcus and Sporosarcina and their relationships to members of the genus Bacillus. FEMS Microbiol. Lett. 93:167-172.

Fox, G. E., K. R. Pechman, and C. R. Woese. 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to pro-caryotic systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 27:44-57.

Fox, G. E., J. D. Wisotzkey, and P. Jurtshuk, Jr. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:166-170.

Gordon, R. E., W. C. Haynes, and C. H.-N. Pang. 1973. The genus Bacillus. Handbook No. 427. U. S. Department of Agriculture. Washington, D. C.

Gray, M. W., D. Sankoff, and R. J. Cedergren. 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 12:5837-5852.

Green, C. J., G. C. Stewart, M. A. Hollis, B. S. Vold, and K. F. Bott. 1985. Nucleotide sequence of the Bacillus subtilis ribosomal RNA operon, rrnB. Gene. 37:261-266.

Hammer, B. W. 1915. Bacteriological studies on the coagulation of e-

vaporated milk. Iwoa Agric. Exp. Sta. Res. Bull. 19:119-131.

Hanger, W., and D. Claus. 1981. Taxonomic studies on Bacillus megaterium and on agarolytic Bacillus strains, p.217-239. In R. C. W. Berkeley, and M. Goodfellow (ed.), The aerobic endospore-forming bacteria. Classification and identification. The Society for General Microbiology. Academic Press, New York.

Hess, A., R. Hollander, and W. Mannheim. 1979. Lipoquinones of some spore-forming rods, lactic acid bacteria and actinomycetes. J. Gen. Microbiol. 115:247-252.

Kandler, O., and N. Weiss. 1986. Genus Sporolactobacillus, p.1139-1141. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Katayama-Fujimura, Y., Y. Komatsu, H. Kuraishi, and T. Kaneko. 1984. Estimation of DNA base composition by High Performance Liquid Chromatography of its Nuclease P1 hydrolysate. Agric. Biol. Chem. 48:3169-3172.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16:111-120.

北原覚雄. 1966. Sporolactobacillus nov. subgen., p.50-59. In 北原覚雄 (編著), 乳酸菌の研究. 東京大学出版会, 東京.

Kitahara, K. 1974. Genus II. Sporolactobacillus, p.550-551. In R. E. Buchanan, and N. E. Gibbons (ed.), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Kitahara, K., and C.-L. Lai. 1967. On the spore formation of Sporolactobacillus inulinus. J. Gen. Appl. Microbiol. 13:197-203.

Kitahara, K., and J. Suzuki. 1963. Sporolactobacillus nov. subgen. J. Gen. Appl. Microbiol. 9:59-71.

Kitahara, K., and T. Toyota. 1972. Auto-spheroplastization and cell-permeation in Sporolactobacillus inulinus. J. Gen. Appl. Microbiol. 18:99-107.

Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:6955-6959.

Logan, N. A., and R. C. W. Berkeley. 1981. Classification and identification of members of the genus Bacillus using API tests, p.105-140. In R. C. W. Berkeley, and M. Goodfellow (ed.), The aerobic

endospore-forming bacteria. Classification and identification. The Society for General Microbiology. Academic Press, New York.

Martinez-Murcia, A. J., and M. D. Collins. 1990. A phylogenetic analysis of the genus Leuconostoc based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol. Lett. 70:73-84.

Martinez-Murcia, A. J., and M. D. Collins. 1991a. Enterococcus sulfureus, a new yellow-pigmented Enterococcus species. FEMS Microbiol. Lett. 80:69-74.

Martinez-Murcia, A. J., and M. D. Collins. 1991b. A phylogenetic analysis of an atypical leuconostoc: description of Leuconostoc fallax sp. nov. FEMS Microbiol. Lett. 82:55-60.

Miller, A., W. E. Sandine, and P. R. Elliker. 1970. Deoxyribonucleic acid base composition of lactobacilli determined by thermal denaturation. J. Bacteriol. 102:278-280.

Minnikin, D. E., and M. Goodfellow. 1981. Lipids in the classification of Bacillus and related taxa, p.59-90. In R. C. W. Berkeley, and M. Goodfellow (ed.), The aerobic endospore-forming bacteria. Classification and identification. The Society for General Microbiology. Academic Press, New York.

Nakamura, L. K., I. Blumenstock, and D. Claus. 1988. Taxonomic study

of Bacillus coagulans Hammer 1915 with a proposal for Bacillus smithii sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:63-73.

中山大樹. 1970. 有孢子乳酸菌群の分類. 日本農芸化学会, 昭和45年度大会, 講演要旨集, p. 315.

Nakayama, O., and M. Yanoshi. 1967a. Spore-bearing lactic acid bacteria isolated from rhizosphere. I. Taxonomic studies on Bacillus laevolacticus nov. sp. and Bacillus racemilacticus nov. sp. J. Gen. Appl. Microbiol. 13:139-153.

Nakayama, O., and M. Yanoshi. 1967b. Spore-bearing lactic acid bacteria isolated from rhizosphere. II. Taxonomic studies on the catalase-negative strains. J. Gen. Appl. Microbiol. 13:155-165.

Neefs, J.-M., Y. V. de Peer, L. Hendriks, and R. D. Wachter. 1990. Complication of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Res. 18:2237-2317.

岡田早苗, 豊田泰, 小崎道雄, 北原覚雄. 1976. Sporolactobacillus inulinusの細胞壁について. 農化. 50:259-263.

Priest, F. 1981. DNA homology in the genus Bacillus, p. 33-57. In R. C. W. Berkeley, and M. Goodfellow (ed.), The aerobic endospore-forming bacteria. Classification and identification. The Society for General Microbiology. Academic Press, New York.

Priest, F., M. Goodfellow, and C. Todd. 1981. The genus Bacillus: a numerical analysis, p.91-103. In R. C. W. Berkeley, and M. Goodfellow (ed.), The aerobic endospore-forming bacteria. Classification and identification. The Society for General Microbiology. Academic Press, New York.

Priest, F., M. Goodfellow, and C. Todd. 1988. A numerical classification of the genus Bacillus. J. Gen. Microbiol. 134:1847-1882.

Roessler, D., W. Ludwig, K. H. Schleifer, C. Lin, T. J. McGill, J. D. Wisotzkey, P. Jurtshuk Jr., and G. E. Fox. 1991. Phylogenetic diversity in the genus Bacillus as seen by 16S rRNA sequencing studies. System. Appl. Microbiol. 14:266-269.

Saitou, N. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.

Saito, H., and K. Miura. 1963. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. Biochim. Biophys. Acta. 72:619-629.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5463-5467.

Seki, T., C. Chung, H. Mikami, and Y. Oshima. 1978. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus Bacillus. Int. J. Syst. Bacteriol. 28:182-189.

Somerville, H., and M. L. Jones. 1972. DNA competition studies within the Bacillus cereus group of bacilli. J. Gen. Microbiol. 73:257-265.

Stackebrandt, E., W. Ludwig, M. Weizenegger, S. Dorn, T. J. McGill, G. E. Fox, C. R. Woese, W. Schubert, and K.-H. Schleifer. 1987. Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives. J. Gen. Microbiol. 133:2523-2529.

Suzuki, J., and K. Kitahara. 1964. Base compositions of deoxyribonucleic acid in Sporolactobacillus inulinus and other lactic acid bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 10:305-311.

Takahashi, H., H. Saito, and Y. Ikeda. 1966. Genetic relatedness of spore bearing bacilli studied by the DNA agar method. J. Gen. Appl. Microbiol. 12:113-118.

Uchida, K., and K. Mogi. 1973. Cellular fatty acid spectra of Sporolactobacillus and some other Bacillus-Lactobacillus intermediates as a guide to their taxonomy. J. Gen. Appl. Microbiol. 19:129-140.

Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Truyper. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:463-464.

Weiss, N., R. Plapp, and O. Kandler. 1967. Die Aminosaeuresequenz des DAP-des DAP-haltigen Mureins von Lactobacillus plantarum und Lactobacillus inulinus. *Arch. Mikrobiol.* 58:313-323.

Whiley, R. A., H. Y. Fraser, C. W. I. Douglas, J. M. Hardie, A. M. Williams, and M. D. Collins. Streptococcus parasanguis sp. nov., an atypical viridans Streptococcus from human clinical specimens. *FEMS Microbiol. Lett.* 68:115-122.

Williams, A. M., and M. D. Collins. 1990. Molecular taxonomic studies on Streptococcus uberis types I and II. Description of Streptococcus parauberis sp. nov. *J. Appl. Bacteriol.* 68:485-490.

Williams, A. M., J. A. E. Farrow, and M. D. Collins. 1989. Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from Streptococcus cecorum. *Lett. Appl. Microbiol.* 8:185-189.

Williams, A. M., J. L. Fryer, and M. D. Collins. 1990. Lactococcus piscium sp. nov. a new Lactococcus species from salmonid fish. *FEMS Microbiol. Lett.* 68:109-114.



Wisotzkey, J. D., P. Jurtshuk Jr., G. E. Fox, G. Deinhard, and K. Poralla. 1992. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of Bacillus acidocaldarius, Bacillus acidoterrestris, and Bacillus cycloheptanicus and proposal for creation of a new genus, Alicyclobacillus gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:263-269.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51:221-271.

Woese, C. R., M. Sogin, D. Stahl, B. J. Lewis, and L. Bonen. 1976. A comparison of the 16S ribosomal RNAs from mesophilic and thermophilic bacilli: some modifications in the Sanger method for RNA sequencing. J. Mol. Evol. 7:197-213.

Yanagida, F., K. Suzuki, T. Kaneko, M. Kozaki, and K. Komagata. 1987a. Morphological, biochemical, and physiological characteristics of spore-forming lactic acid bacteria.

Yanagida, F., K. Suzuki, T. Kaneko, M. Kozaki, and K. Komagata. 1987b. Deoxyribonucleic acid relatedness among some spore-forming lactic acid bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 33:47-55.

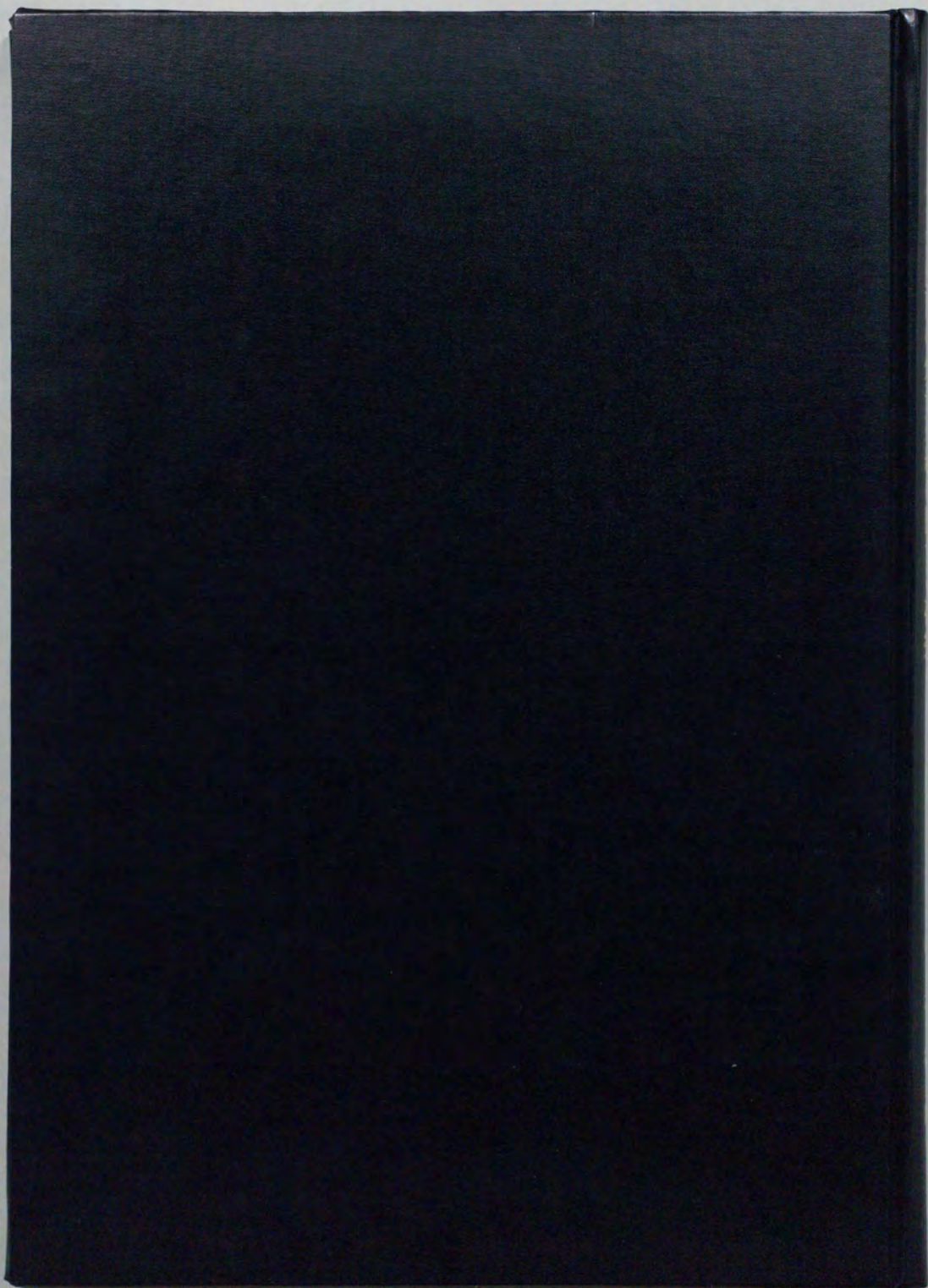
## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始、御指導、御鞭撻を頂きました東京大学応用微生物研究所 教授 山里一英先生に深く感謝いたします。また、有益なる御教示、特に PCR-RFLP 法をお教え頂きました東京大学農学部 助教授小柳津広志先生に深く感謝いたします。有益なる御教示、励ましを頂き、また電子顕微鏡では大変にお世話になりました元東京農工大学 教授 倉石衍先生に深く感謝いたします。静岡大学 教授 山田雄三先生には有益なる御助言と励ましを頂きました。ここに深く感謝いたします。東京理科大学 教授 西村行正先生にはいつも御助言、励ましを頂き、また、本研究の一部の実験を東京理科大学で行う場を頂き、深く感謝いたします。東京農業大学 講師 岡田早苗先生には貴重な御助言、及び乳酸の旋光性を測定して頂き、心より感謝いたします。また、山梨大学 助手 柳田藤寿先生には貴重な御助言を頂き、心より感謝いたします。

本研究に供試した菌株を分譲して頂きました I A M (東京大学応用微生物研究所微生物微細藻類総合センター)、J C M (理化学研究所微生物系統保存施設)、N R I C (東京農業大学菌株保存施設)、の各保存機関に心より感謝いたします。

東京理科大学で実験を行った際に、たいへん御協力を頂きました理工学部応用生物科学科西村研究室の皆様にご心より感謝いたします。

最後になりましたが、東京大学応用微生物研究所微生物微細藻類総合センターの皆様、及び第3研究部の皆様には研究生活全般を通じてお世話になりました。たいへん有り難うございました。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

