

9 6 5 3 魚介類における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の研究

助成研究者：小林 とよ子(東海学園女子短期大学)

共同研究者：上野 一恵(岐阜医療技術短期大学)

演者らが海産魚介類から分離し、分類・命名した好塩性の嫌気性菌の新種とした *Haloanaerobium butyricum* JCM 9809株(理科学研究所菌株保存室に新種菌株として登録保存)の生化学的諸性状および細菌 DNA について検討した。DNAの分析は、塩基組成である GC含量(GC contents)と DNA の塩基配列の類似性を示す DNA 相同性(DNA homology)について検討した。好塩性の嫌気性菌の対照菌株として、*Haloanaerobium praevalens* DSM 2228株を用いた。本菌は Zeikus らにより Great Salt Lakeの湖底の沈殿物から分離された好塩性無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の type strainでもある。

細胞の大きさは *H. butyricum* JCM 9809株では $1\sim 2 \times 2.4 \mu\text{m}$ であり、*H. praevalens* DSM 2228 では $0.9\sim 1.1 \times 2.0\sim 2.6 \mu\text{m}$ と、ほぼ同程度の大きさであった。電顕像における両菌株の共通点は、いずれも鞭毛や線毛を欠いており、典型的なグラム陰性桿菌の特徴である内膜と外膜が認められた。48時間嫌気培養後の集落の形態は、*H. butyricum* JCM 9809株では、2% NaCl 添加 GAM 寒天上に1mm 前後のやや黄色を帯びた光沢のある円形の集落を形成した。一方、対照菌株である *H. praevalens* DSM 2228株は、2% NaCl 添加 GAM 寒天平板培地上では集落の形成は認められず、13% NaCl 添加 GAM 寒天上でのみ発育した。グラム染色標本での菌体細胞の形態はいずれも先端がやや丸い、多形性のグラム陰性桿菌で、芽胞形成および運動性は認められなかった。至適発育温度の比較では、*H. butyricum* JCM 9809株は37℃を至適発育温度とし、23℃では極めて緩慢な発育を示した。しかし、*H. praevalens* DSM 2228株は5℃から60℃までの幅広い発育温度域を有していた。また、発育に対するNaCl濃度の影響においても両菌株には大きな差が認められた。*H. butyricum* JCM 9809株の発育可能なNaCl濃度域は1%から4%までと狭く、その至適発育のNaCl濃度は2%であった。一方、*H. praevalens* DSM 2228株の発育可能なNaCl濃度域は2%から30%までと広く、かつ、その至適発育のNaCl濃度は13%であった。

DNA のGC含量の検討では、*H. butyricum* JCM 9809株のGC %は30.3であり、*H. praevalens* DSM 2228株のGC%は29.0と、両菌株のGC%は比較的近い数値を示した。しかし、両菌株のDNA-DNA の相同性は、*H. praevalens* DSM 2228 株が100%のとき、*H. butyricum* JCM 9809株とは10%しか相同性が認められず、両菌株は大きく相違した。

また、28種類の炭水化物の分解能試験の成績の違い、培養液中の代謝産物の分析結果、乳酸からのプロピオン酸の産生、その他酵素反応などの違いから *H. butyricum* JCM 9809株は *H. praevalens* とは明らかに異なる新しい菌種であると考えられた。

9653 魚介類における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の研究

助成研究者：小林 とよ子 (東海学園女子短期大学)

共同研究者：上野 一恵 (岐阜医療技術短期大学)

1. 研究目的

著者らは、これまでに市販されている海産魚介類における好塩性の嫌気性菌の分布¹⁻²⁾について検討し、これらの海産魚介類から好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌(以下、好塩性の嫌気性菌と省略)が高率に分離されることを平成6年度のソルト・サイエンス助成研究報告集¹⁾で報告した。

好塩性の嫌気性菌が発育するのに必要な最低条件は、食塩が一定濃度に存在し、かつ酸素を全く含まない環境が保持されている事である。好塩性の嫌気性菌の発育には、一般の細菌が必要とする栄養源の外に、この2条件が満たされて始めて、発育が可能となる。

本報では、著者らが海産魚介類から分離し、分類・命名した好塩性の嫌気性菌の新種とした *Haloanaerobium butyricum* JCM 9809株(理科学研究所菌株保存室に新種菌株として登録保存)の生化学的諸性状および細菌 DNA の分析について報告する。DNAの分析は、塩基組成である GC含量 (GC contents)と DNA の塩基配列の類似性を示す DNA 相同性 (DNA homology) について検討した。

好塩性の嫌気性菌の対照菌株として、著者らの分離菌株とは形態などがよく似ている *Haloanaerobium praevalens* DSM 2228株を用いた。本菌は Zeikus³⁾らにより Great Salt Lakeの湖底の沈殿物から分離された好塩性無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌のtype strainでもある。

2. 研究方法

2.1. 使用菌株

著者らが海産魚介類から分離、分類・命名した *H. butyricum* JCM 9809株および対照菌株として *H. praevalens* DSM 2228株を用いた。

2.2. 各種生化学的性状の検討

培養に用いた基礎培地および培養法は、前報¹⁻²⁾の記載に従った。すなわち、*H. butyricum* JCM 9809株の培養には培地にNaClを2%に添加、*H. praevalens* DSM 2228株の培養には培地中にNaClを13%に添加して用いた。各種炭水化物分解能の試験には NaCl を加えた GAM 糖不含半流動高層寒天培地に各種の炭水化物を添加し、7日間、37℃にて培養後、pH の変化をガラス電極 pH メータを用いて測定した。いずれも嫌気環境下で培養した。嫌気培養には鉄系酸素吸収タイプ脱酸素剤であるアネロパック・ケンキ(三菱ガス化学)を

用いた。

代謝産物の測定には、ガスクロマトグラフィーによる低級脂肪酸の分析を行った。また、API-ZYM を用いて19種の酵素反応を測定した。

2.3. DNA の GC 含量と相同性の検討

DNA は、すでに記載⁴⁻⁶⁾した手順に従い、多量培養(900ml)にて得られた菌体(約2-4g)より Marmur の変法⁵⁾にて分離・精製した。ついで、熱変性 DNA (10 μ)に等量の核酸分解酵素である Nuclease P₁(ヤマサ醤油)を加えて加水分解し、生成したヌクレオチドを試料として、Hibar Lichrosorb RP-18を用いた逆相分配 HPLC にて分析した。

DNA 相同性は、De Ley ら⁷⁾による理論に従い、武藤らの方法⁸⁾によって、DNA 雑種形成の反応速度とDNA 相同性の間の相関関係から求めた。反応液は、2倍濃度の SSC (300 mM NaCl, 30 mM Na₃ Citrate, pH7.0)を用い、DNAは超音波処理 (200 W, 30 sec.)により断片化し、100°C20分の熱処理により1本鎖DNAとして測定に供した。

反応速度の測定は DNA 雑種形成の過程を260 nm の吸光度変化で定量化し、反応の初速度を得た。この反応速度値を用いてDe Ley ら⁷⁾により導かれた理論式に従い、DNA相同性を推定した。

2.4. 毒性試験

各濃度の NaCl 加 GAM broth (ニッスイ) にて37 °C、7日間増菌培養後、3,000 rpm で5分間遠心し、その上清液を Molcut II 10,000(Millipore)で限外濾過することにより、10倍濃縮した。その濃縮液 0.3 mlを ICR 雄マウス (20g \pm 1 g) に腹腔内注射し、マウスの全身状態の変化ならびに生死について4日間観察した。

3. 研究結果

3.1. 生化学的性状

H. butyricum JCM 9809株と好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の type strainである *H. praevalens* DSM 2228株との生化学的性状について比較した成績をTable 1 に示した。48時間嫌気培養後の集落の形態は、*H. butyricum* JCM 9809株では、2% NaCl 添加 GAM 寒天上に1mm 前後のやや黄色を帯びた光沢のある円形の集落を形成した。一方、対照菌株である *H. praevalens* DSM 2228株は、2% NaCl 添加 GAM 寒天平板培地上では集落の形成は認められず、13% NaCl 添加 GAM 寒天上で *H. butyricum* JCM 9809株と類似の集落が形成されたが、幾分濃い黄色を呈していた。グラム染色標本により菌体細胞の形態はいずれも先端がやや丸い、多形性のグラム陰性桿菌で、芽胞形成および運動性は認められなかった。

至適発育温度の比較では、*H. butyricum* JCM 9809株は37°Cを至適発育温度とし、23°Cでは極めて緩慢な発育を示した。しかし、*H. praevalens* DSM 2228株は5°Cから60°Cまでの幅広い発育温度域を有していた。また、発育に対するNaCl濃度の影響においても両菌株

には大きな差が認められた。*H. butyricum* JCM 9809株の発育可能なNaCl濃度域は1%から4%までと狭く、その至適発育のNaCl濃度は2%であった。一方、*H. praevalens* DSM 2228株の発育可能なNaCl濃度域は2%から30%までと広く、かつ、その至適発育のNaCl濃度は13%であった。

ブドウ糖からの代謝産物のガスクロマトグラフィーによる分析所見は、*H. butyricum* JCM 9809株は、ブドウ糖含有および不含培地のいずれにおいても、プロピオン (p), 酢酸 (A), 酪酸 (B) を産生した。一方、*H. praevalens* DSM 2228 株の代謝産物のパターンは、酪酸 (B) が主要産物で、少量の酢酸 (a) を産生した。また、スレオニンからプロピオン酸 (P) の産生は、両菌株ともプロピオン (P) を産生した。しかし乳酸からプロピオン酸 (P) の産生では、*H. butyricum* JCM 9809株のみプロピオン酸(P)を産生したが、*H. praevalens* DSM2228 株はプロピオン酸 (P) を産生しなかった。また、いずれの菌株も揮発性低級脂肪酸の産生が主で、不揮発性脂肪酸の産生は殆ど認められなかった。

両被検菌株のゼラチン液化能は、いずれの菌株においても弱陽性を示したが、2%胆汁培地中での発育は両菌株とも陰性であった。一方、インドール産生能は *H. butyricum* JCM 9809株では陽性であったが、対照株である *H. praevalens* DSM2228 株では陰性であった。硝酸塩の還元、レシチナーゼ産生、リパーゼ産生、ウレアーゼ産生、カタラーゼ産生、溶血性およびマウス致死性はいずれの菌株とも陰性であった。

27種類の炭水化物の発酵能試験の成績(Table 2)では、*H. butyricum* JCM 9809株および *H. praevalens* DSM 2228 株はフラクトースおよびグルコースを共に分解したが、イノシトール、マルトース、マンノースの分解能に差が認められた。すなわち、*H. butyricum* JCM 9809株ではイノシトール、マルトースは陽性であったが、*H. praevalens* DSM 2228 株では陰性であった。一方、*H. butyricum* JCM 9809株ではマンノースは陰性であったが、*H. praevalens* DSM 2228 株では陽性を示した。残り22種類の糖分解性状の成績は両菌株共に陰性であった。一般に、両菌株の炭水化物の分解能は弱く、炭水化物発酵陽性例でも pH の低下の程度は低く pH 5.6 ~ 5.9 に留まった。

API-ZYM を用いた19種の酵素反応の成績(Table 3)では、*H. butyricum* JCM9809株は酸性ホスファターゼとホスホアミダーゼを産生した。しかし、*H. praevalens* DSM2228株は検討した19種類の酵素反応はすべて陰性であった。

H. butyricum JCM 9809株の電顕像(Fig. 1 B)では鞭毛や線毛は認められなかった。細胞の大きさは *H. butyricum* JCM 9809株では $1\sim 2 \times 2.4 \mu\text{m}$ であり、*H. praevalens* DSM 2228 株では $0.9\sim 1.1 \times 2.0\sim 2.6 \mu\text{m}$ と、ほぼ同程度の大きさであった。通性嫌気性菌である *Escherichia coli* や 対照菌株である *H. praevalens* DSM 2228 株(Fig. 1 A)と比較して、著者らの分離菌株である *H. butyricum* JCM 9809株では外膜がやや薄く、内膜との間が狭いが、典型的なグラム陰性桿菌の Cellwall の微細構造の所見を示した。

3.2. DNA の GC 含量と相同性の検討

DNA のGC 含量の検討(Table 4)では、*H. butyricum* JCM 9809株のGC %は30.3であり、*H. praevalens* DSM 2228株の GC%は29.0と、両菌株のGC%は比較的近い数値を示した。しかし、両菌株のDNA-DNA の相同性は分光学的方法による検討では、*H. praevalens* DSM 2228 株が100%のとき、*H. butyricum* JCM 9809株とは10%しか相同性が認められず、両菌株は大きく相違した。

4. 考察

好塩性の嫌気性菌に関する報告は少なく、現存する菌株としては、Zeikusら³⁾により Great salt lake の沈殿物から *Haloanaerobium praevalens*、次いで Orenら⁹⁾により Dead sea の沈殿物から *Halobacteroides halobius* と *Clostridium lortetii* の2菌種が分離されたのが始まりである。後に、Orenら¹⁰⁾は、16S rRNA cataloging の配列から、これらの菌種は互いに関連があり、同じ属の細菌であるとして *Haloanaerobiaceae* という新しいfamily の提唱がなされた。いずれにしても、これらの菌株は20%以上の塩濃度を示す特殊な湖底の泥から分離された強い好塩性 (Extreme halophile) を示す嫌気性菌である。一方、著者らが生鮮海産魚介類から分離・命名した *H. butyricum* JCM 9809株のNaClの発育濃度域は1~5%で、その至適濃度は2%のいわゆる低等度の好塩性 (Slight halophile) を示す嫌気性菌であり、塩濃度の要求性において大きな相違が認められた。

近年、一般の海水からの好塩性の嫌気性菌の分離に関する報告¹¹⁻¹²⁾ がわずかにみられるようになった。しかし、これらの多くは塩田からの分離報告例であり、海産魚介類における好塩性の嫌気性菌の分布に関する報告は極めて少ない。

著者らはこれまでに海産魚介類における好塩性の嫌気性菌の分布¹⁻²⁾ について詳細に検討し、海産魚介類からは好塩性の嫌気性細菌が高率に分離される事を報告してきた。また、海産魚介類の消化管内における好塩性嫌気性菌の定量培養法による検討で、生菌数は $4.3 \times 10^3 \sim 18.8 \times 10^3$ CFU/g の範囲で、これらの細菌数は比較的少ないことを認めている。しかし、直接塗抹分離培養法での検討では、好塩性の嫌気性菌の分離率は46.5%(114検体中53例)と高く、これらの著者らの検討結果からしても好塩性の嫌気性菌は海産魚介類の腸管内腸内細菌叢を形成する一菌種であることが推定された。

今回、好塩性の嫌気性菌の対照株として用いた *Haloanaerobium praevalens* の形態はグラム陰性桿菌で、芽胞を形成せず非運動性である。これらの細胞形態は著者らの分離菌である *H. butyricum* JCM 9809株と類似していた。また、電顕像における両菌株の共通点は、いずれの菌株も線毛や鞭毛を欠いており、細胞壁の微細構造は極めて類似していて、共にグラム陰性桿菌の特徴である内膜と外膜が認められた。

近年、細菌の分類法において DNA 分析は極めて重要な役割を果たしている。特に、DNA のGC含量 (GC contents) は新菌種を決定する際、記載に不可欠の項目である。さら

に、DNA の塩基配列の類似性を示す DNA 相同性 (DNA homology) は、分類学的により極めて重要であることも明らかとなって来た。本実験では、H. butyricum JCM 9809株の GC 含量は30.3%であり、H. praevalens DSM 2228株のそれは29.0%と両菌株は比較的近値を示した。一方、両菌株間における DNA 相同性がH. praevalens DSM 2228株の菌株間で100%であるのに、H. praevalens DSM 2228株とH. butyricum JCM 9809株との間では10%のみの相同性を示し、両菌株間には大きな相違が認められた。

また、28種類の炭水化物の分解能試験の成績の違い、培養液中の代謝産物の分析結果、乳酸からのプロピオン酸の産生、その他酵素反応などの違いからH. butyricum JCM 9809株は H. praevalens とは異なる新しい菌種であると考えられた。

5. 今後も課題

H. butyricum JCM 9809株および H. praevalens DSM 2228株の病原性に関する検討については、培養ろ液を限外濾過により10倍濃縮し、その濃縮液をマウスに腹腔内に注射し、その生死を観察した結果では、マウス致死性はいずれも陰性であった。しかし、これらの菌株の毒性についてはいまだ不明であり、著者らは今後さらに他の病原性因子の検索方法を検討し、また各種の培養細胞に対する細胞毒性試験などについても検討したいと考えている。

6. 文献

- 1) 小林とよ子、上野一恵 他：貝類から分離した好塩性の嫌気性グラム陰性無芽胞桿菌の研究；嫌気性菌感染症研究、16、87-94、1986.
- 2) 小林とよ子、上野一恵：魚介類における好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の研究；ソルト・サイエンス助成研究報告集Ⅱ、355-366、1994.
- 3) Zeikus, J. G. et al: Isolation and description of *Haloanaerobium praevalens* gen. nov. and sp. nov., an obligately anaerobic halophile common to Great Salt Lake sediments. *Current Microbiology*, 9, 225-234, 1983.
- 4) 今朝洞忠孝、上野一 他：嫌気性菌 DNAの GC含量測定における高速液体クロマトグラフィ法と融解温度法の比較検討；嫌気性菌感染症研究、17、195-200、1987.
- 5) Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *J. Mol. Biol.*, 3, 208-218, 1961.
- 6) Fujimoto, M. et al: Microbiological identification of single cell proteins based on DNA GC contents *Agr. Biol. Chem.*, 38(9)155, 1974.
- 7) De Ley et al: The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates, *Eur. J. Biochem.*, 12:133-142, 1970.

- 8) 武藤吉徳、上野一恵 他 : 分光学的手法による嫌気性菌のGC 含量と DNA相同性の決定; 嫌気性菌感染症研究、17、201-206、1987.
- 9) Oren, A. et al: Halobacteroides halobiusgen. nov., sp. nov., a Moderately Halophilic Anaerobic Bacterium from the Bottom Sediments of the Dead Sea; System. Appl. Microbiol. 5, 58-70, 1984.
- 10) Oren, A. et al : Haloanaerobiaceae: A New Family of Moderately Halophilic, Obligatory Anaerobic Bacteria System. Microbiol. 5, 71-80, 1984.
- 11) Ollivier, B. et al : Anaerobic Bacteria from Hypersaline Environments. Microbiological Reviews, 58(1) , 27-38, 1994.
- 12) Rainey, F. A. et al : The Taxonomic Status of the Fermentative Halophilic Anaerobic Bacteria : Description of Haloanaerobiales ord. nov., Halobacteroidaceae fam. nov., Orenia gen. nov. and further Taxonomic Rearrangements at the Genus and Species Level ; Anaerobe, 1, 185-199, 1995.

Table 1 Characteristics differentiating Haloanaerobium praevalens DSM 2228 and Haloanaerobium butyricum JCM 9809

Organism	<u>H. butyricum</u> JCM 9809	<u>H. praevalens</u> DSM 2228
Characteristic		
Colony morphology	circular , yellow, smooth	circular, yellow smooth
Gram stain	—	—
Cell morphology	Rod	Rod
Spore	—	—
Motile	—	—
Cell size (μm)	1~2×2.4	0.1~11×2.0~2.6
Optimum temperature (°C)	37	37
NaCl(%) require for growth	1~4	3~29
* ¹ Metabolites from:		
Glucose	B, P, a	B, a
Threonine→C ³	+	+
Lactate →C ³	+	—
Gelatin liquefaction	+	+
Growth in 2%bile medium	—	—
Indole production	+	—
Nitrate reduction	—	—
Lipase production	—	—
Urease production	—	—
Catalase production	—	—
Hemolysin production	—	—
Mice lethality	—	—

*¹ a : Acetic acid, B, b : Butyric acid, P : Propionic acid,

Table 2 Biochemical characteristics differentiating of Haloanaerobium praevalens DSM 2228 and Haloanaerobium butyricum JCM 9809

Organism Characteristic	<u>H. butyricum</u> JCM 9809	<u>H. praevalens</u> DSM 2228
Cellobiose	—	—
Esculin pH	—	—
Esculin hydrolyzed	—	—
Fructose	+	+
Glucose	+	+
Inositol	+	—
Maltose	w	—
Mannose	—	+
Ribose	—	—
Adonitol	—	—
Amygdalin	—	—
Arabinose	—	—
Erythritol	—	—
Glycogen	—	—
Lactose	—	—
Mannitol	—	—
Melezitol	—	—
Melibiose	—	—
Raffinose	—	—
Rhamnose	—	—
Salicin	—	—
Sorbitol	—	—
Starch pH	—	—
Starch hydrolyzed	—	—
Sucrose	—	—
Trehalose	—	—
Xylose	—	—
Galactose	—	—
Dulcitol	—	—

Table 3 Comparative characteristics of Haloanaerobium praevalens DSM 2228 and Haloanaerobium butyricum JCM 9809 used by API-ZYM

Organism Enzyme	<u>H. butyricum</u> JCM 9809	<u>H. praevalens</u> DSM 2228
Phosphatase alkaline	—	—
Esterase (C ₄)	—	—
Esterase lipase (C ₈)	—	—
Lipae (C ₁₄)	—	—
Leucine arylamidase	—	—
Valine arylamidase	—	—
Cystine arylamidase	—	—
Trypsin	—	—
Chymotrypsin	—	—
Phosphatase acid	+	—
Phosphoamidase	+	—
α-galactosidase	—	—
β-galactosidase	—	—
β-glucuronidase	—	—
α-glucosidase	—	—
β-glucosidase	—	—
N-acetyl-glucosaminidase	—	—
α-mannosidase	—	—
α-fucosidase	—	—

Table 4 Mol % G+C in the DNA and DNA-DNA homologys

Strain	G+C contents (mol %)	DNA homology between <u>H. praevalens</u> DSM 2228 and <u>H. butyricum</u> JCM 9809	
		* ¹ <u>H. praevalens</u>	<u>H. butyricum</u> * ²
<u>H. praevalens</u> DSM 2228	29.0	100	ND
<u>H. butyricum</u> JCM 9809	30.3	10	100

*¹ H. : Haloanaerobiales

*² ND: Not detected

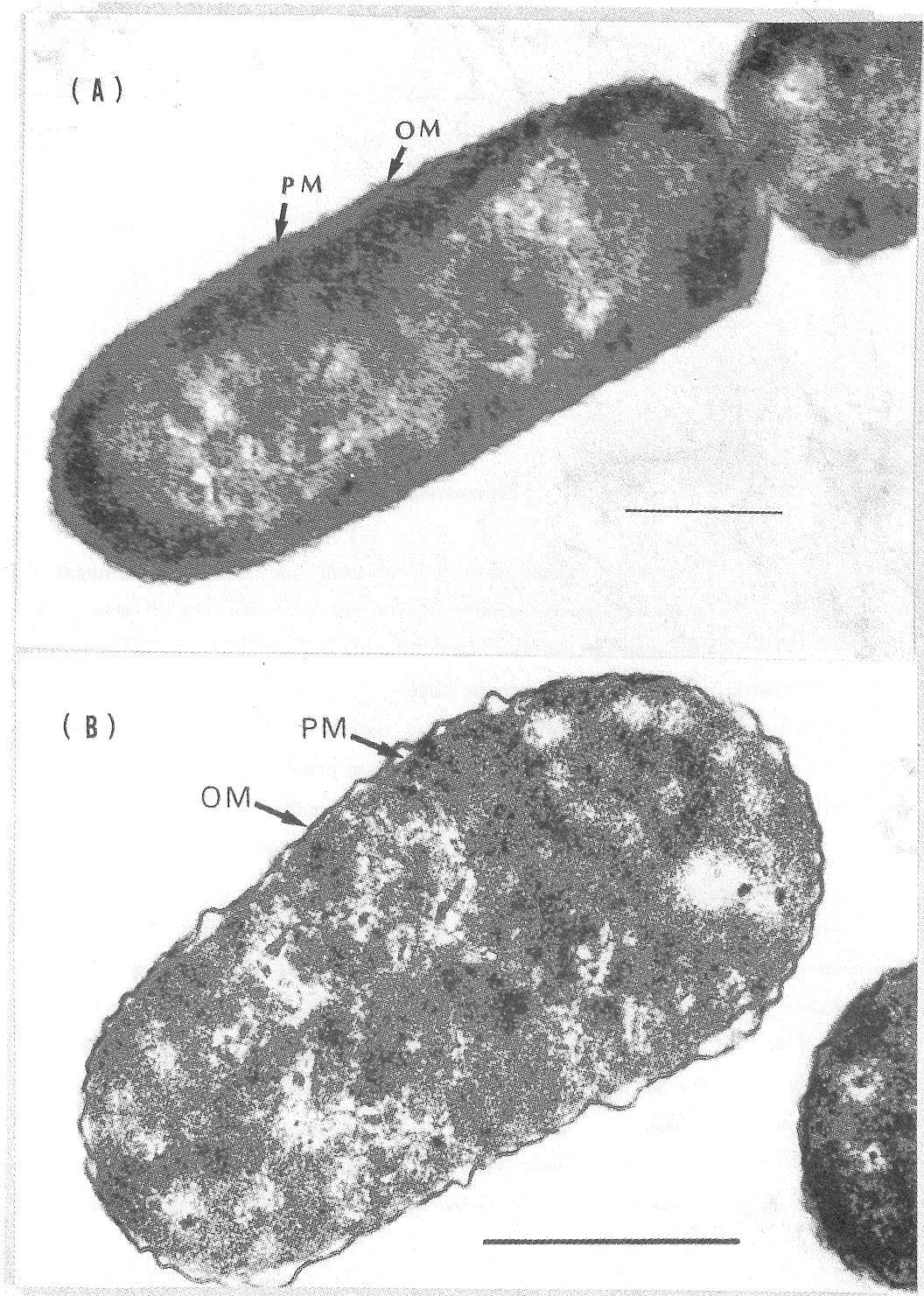


Fig. 1 Electron micrograph of *Haloanaerobium praevalens* DSM 2228 (A) and *Haloanaerobium butyricum* JCM 9809 (B)
OM ; outer wall membrane, PM ; cytoplasmic membrane, Bar marker ; 0.5 μm

**On halophilic non-sporeforming anaerobic
Gram negative rods in sea fish and shell-
fishes**

— Haloanaerobium butyricum sp. nov., a Halophilic Anaerobic Bacteria —

Toyoko Kobayashi and Kazue Ueno*

Tokai Gakuen Women's College and Gifu College of Medical Technology*

Summery

A new species of Halophilic anaerobic, rod-shaped, non-motile, Gram-negative, non-sporulating bacterium isolated from the sea fish and shellfishes. This organism proliferated optimally in approximately 2 ~ 3 % or ≥ 5 salt. It possessed single outerwall membranous layer.

We compared this strain of halophilic, rod isolated from the sea fish and shellfishes with DSM 2228 strain of Haloanaerobium praevalens (Type strain of genus Haloanaerobium). Acetic acid, butyric acid and propionic acid were the major glucose fermentation end products formed. Glucose, fructose, inositol and maltose were fermented.

The spectrophotometric method for determining G+C content and DNA homology were examined using DNA from H. praevalens DSM 2228 and H. butyricum JCM 9809. G+C content of H. praevalens DSM 2228 was 29.0 mol % and H. butyricum JCM 9809 was 30.0 mol %. DNA homology between H. praevalens DSM 2228 and H. butyricum JCM 9809 was only 10 %. A number of additional biochemical and physiological tests were performed.

Base on phenotypic and genotypic findings of our isolate, a new species, Haloanaerobium butyricum sp. nov., is proposed. The type strain is strain H. butyricum is strain JCM 9809.