

# 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

——好塩性嫌気性桿菌の新菌種について——

小 林 と よ 子

On Halophilic Non-Sporeforming Anaerobic Gram Negative Rods  
in Sea Fish and Shellfishes

*Haloanaerobium butyricum* sp. nov., a Halophilic Anaerobic Bacterium

Toyoko Kobayashi

## 緒 言

市販の海産魚介類における好塩性の嫌気性菌の分布<sup>1-2)</sup> 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すでに報告した。

本報では、著者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 相合性（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、著者の分離菌株と形態などがよく似ている *Haloanaerobium praevalens* DSM 2228 株を用いた。本菌は Zeikus ら<sup>3)</sup> により Great Salt Lake 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。

## 材料及び方法

### 1. 使用菌株

著者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. 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<sup>1-2)</sup>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% 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。

## 3. DNA の GC 含量と相同性の検討

DNA は、すでに記載<sup>4-6)</sup>した手順に従い、多量培養 (900ml) にて得られた菌体 (約 2-4 g) より Marmur の変法<sup>5)</sup>にて分離・精製した。ついで、熱変性 DNA (10 $\mu$ ) に等量の核酸分解酵素である Nuclease P<sub>1</sub> (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<sup>7)</sup>による理論に従い、武藤らの方法<sup>8)</sup>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 (300mM NaCl, 30mM Na<sub>3</sub> Citrate, pH 7.0) を用い、DNA は超音波処理 (200W, 30sec.) により断片化し、100℃ 20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 260nm 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<sup>7)</sup>により導かれた理論式に従い DNA 相同性を推定した。

## 4. 毒性試験

各濃度の NaCl 加 GAM broth (ニッスイ) にて 37℃、7日間増菌培養後、3,000rpm 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 0.3ml を ICR 雄マウス (20g  $\pm$  1g) 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。

# 結 果

## 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.*

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

Organism	<i>H. butyricum</i> JCM 9809	<i>H. praevalens</i> 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
* <sup>1</sup> Metabolites from:		
Glucose	B, P, a	B, a
Threonine → C <sup>3</sup>	+	+
Lactate → C <sup>3</sup>	+	—
Gelatin liquefaction	+	+
Growth in 2% bile medium	—	—
Indole production	+	—
Nitrate reduction	—	—
Lipase production	—	—
Urease production	—	—
Catalase production	—	—
Hemolysin production	—	—
Mice lethality	—	—

\*<sup>1</sup> a : Acetic acid, B, b : Butyric acid, P : Propionic acid,

*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、多形状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3%から29%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酸を産生した。しかし乳酸からプロピオン酸の産生では, *H. butyricum* JCM 9809株のみプロピオン酸を産生したが, *H. praevalens* DSM 2228株はプロピオン酸を産生しなかった。また, いずれの菌株ともに, 揮発性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* DSM 2228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* JCM 9809株は酸性ホスファターゼとホスホアミターゼ活性を示した。しかし, *H. praevalens* DSM 2228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株の電顕像を Fig. 1 B に示した。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大腸菌 (*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株は外膜がやや薄く内膜との間が狭い傾向にあるが, いずれも典型的なグラム陰性桿菌の Cell wall の微細構造の所見を示した。なお, 鞭毛や線毛は認められなかった。

DNA の GC 含量の検討 (Table 4) では, *H. butyricum* JCM 9809株の GC 含量は30.3 mol% であり, *H. praevalens* DSM 2228株の GC 含量は29.0 mol% と, 両菌株の GC 含量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。

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

Organism Characteristic	<i>H. butyricum</i> JCM 9809	<i>H. praevalens</i> 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	<i>H. butyricum</i> JCM 9809	<i>H. praevalens</i> DSM 2228
Phosphatase alkaline	—	—
Esterase (C <sub>4</sub> )	—	—
Esterase lipase (C <sub>8</sub> )	—	—
Lipae (C <sub>14</sub> )	—	—
Leucine arylamidase	—	—
Valine arylamidase	—	—
Cystine arylamidase	—	—
Trypsin	—	—
Chymotrypsin	—	—
Phosphatase acid	+	—
Phosphoamidase	+	—
$\alpha$ -galactosidase	—	—
$\beta$ -galactosidase	—	—
$\beta$ -glucuronidase	—	—
$\alpha$ -glucosidase	—	—
$\beta$ -glucosidase	—	—
N-acetyl-glucosaminidase	—	—
$\alpha$ -mannosidase	—	—
$\alpha$ -fucosidase	—	—

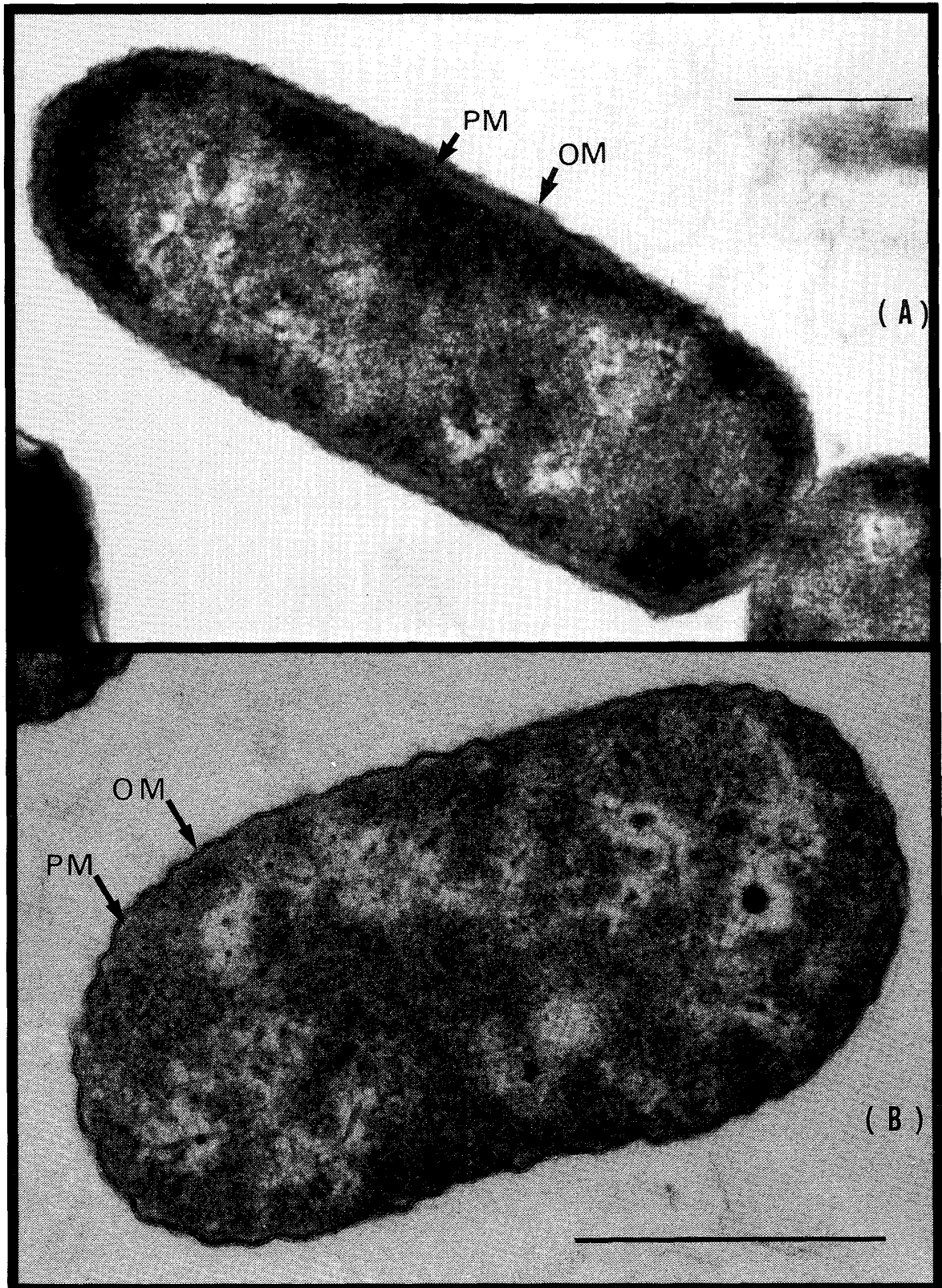


Fig. 1 Electron micrograph of *Haloanaerobium praevalens* DSM 2228 (A) and *Haloanaerobium butyricum* JCM 9809 (B)  
OM; outer wall membrane, PM; cytoplasmic membrane, Bar marker; 0.5 $\mu$ m

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

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

\*<sup>1</sup> H. : *Haloanaerobium*\*<sup>2</sup> ND: Not detected

## 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<sup>3)</sup>により Great salt lake の沈殿物から *Haloanaerobium praevalens*, 次いで Orenら<sup>9)</sup>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<sup>10)</sup>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1~4%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<sup>11-12)</sup>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<sup>1-2)</sup>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菌が高率に分離される事を報告してきた。また、海産貝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) と高い。これまで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 *H. praevalens* DSM 2228株の形態はグラム陰

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の分離菌である *H. butyricum* JCM 9809株と類似していた。電顕像における両菌株の共通点は、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。また、走査電顕ではいずれの菌株も線毛や鞭毛を欠いていた。

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-DNA の相同性は、分類学的に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 mol%であり、*H. praevalens* DSM 2228株のそれは29.0 mol%と両菌株は比較的近値を示し、同一 genus に属するものと推定された。一方、両菌株間における DNA-DNA の相同性は、*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、両菌株は大きく異なり、異なった菌種と推定された。

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。

*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、培養濾液を限外濾過により10倍濃縮し、その濃縮液をマウス腹腔内に注射し、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、今後さらに病原性因子の検索を検討する必要がある。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。

なお、この研究の一部はソルト・サイエンス研究財団からの助成を受けたもので、深く感謝致します。

## 要 約

著者らが新鮮な海産魚介類から分離・命名した好塩性の無芽胞グラム陰性嫌気性桿菌の新菌種である *H. butyricum* JCM 9809株は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株とは、各種生化学的性状、代謝産物の分析、および細菌 DNA の GC 含量比と両菌株から得られた DNA を用いて DNA-DNA 相同性について比較検討した。その結果、著者らが分離した *H. butyricum* JCM 9809株は *H. praevalens* とは明らかに異なる新菌種であることが推定された。

## 文 献

- 1) 小林とよ子, 朝日良成, 今朝洞忠孝, 渡辺邦友, 上野一恵: 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., Hegge, P. W., Thompson, T. E., Phelps, T. J. and Langworthy, T. A.: 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, 武藤吉徳, 渡辺邦友, 上野一恵: 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ー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 micro organisms, *J. Mol. Biol.*, 3, 208-218, 1961.
- 6) Fujimoto, M., Kuninaka, A. and Yoshino, H.: Microbiological identification of single cell proteins based on DNA GC contents *Agr, Biol. Chem.*, 38 (9) 155, 1974.
- 7) De Ley, J., Cattoir, H., and Reynaerts, A.: The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates, *Eur. J. Biochem.*, 12: 133-142, 1970.
- 8) 武藤吉徳, 今朝洞忠孝, 加藤直樹, 渡辺邦友, 上野一恵: 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., Weisburg, W. G., Kessel, M., and Woese, C., R.: *Halobacteroides halobius* gen. 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., Paster, B., and Woese, C. R.: *Haloanaerobiaceae*: A New Family of Moderately Halophilic, Obligatory Anaerobic Bacteria System. *Microbiol.* 5, 71-80, 1984.
- 11) Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J. and Mah, R. A.: Anaerobic Bacteria from Hypersaline Environments. *Microbiological Reviews*, 58 (1), 27-38, 1994.
- 12) Rainey, F. A., Zhilina, T. N., Boulygina, E. S., Stackebrandt, E., Tourova, T. P. and Zavarzin, G. A.: 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; *Aanaerobe*, 1, 185-199, 1995.