Mini Review

VBNC 海洋細菌の分子生物学的検討

VBNC (viable but nonculturable) marine bacteria on the molecular biological aspects

吉永 郁生, 片野坂徳章, 上野 雄介

IKUO YOSHINAGA, NORIAKI KATANOZAKA and YUSUKE UENO

京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻海洋微生物学研究室

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

*Laboratory of Marine Microbiology, Department of Applied Biosciences,
Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan*

(受付 1999 年 1 月 29 日—受理 1999 年 3 月 19 日)

Viable but nonculturable (VBNC) bacteria generally inhabit marine environments, especially oligotrophic open ocean, because most marine bacteria which are biologically active can not be cultivated by traditional microbiological protocols. Some researchers argue that VBNC is a temporary state in marine bacteria which are originally cultivated by normal methods, induced by several environmental stresses, for example low temperature, high pressure, and extremely low nutrient concentrations. Other researchers argue that VBNC marine bacteria are novel and unique bacterial groups which have never been isolated by the traditional microbiological techniques. Some phenomenon in marine *Vibrio* strains support the former and phylogenetic studies on bacterial 16S ribosomal RNA genes directly isolated from seawater samples support the latter view. We introduced here marine oligotrophic bacteria, which were isolated by some low-nutrient media containing only 0.5 mg/L of organic nutrients. These bacteria are unculturable in all high-nutrient media containing more than 0.5 g/L of organic nutrients, the concentration which is normally used for bacterial cultivation, and their 16S rRNA gene sequences indicate that they are phylogenetically novel.

Key words: obligate oligotrophs, 16S rRNA genes, viable but nonculturable

1. はじめに

顕微鏡で観察する場合、海水中の細菌粒子数（直接計数値）は、一般に $10^5 \sim 10^6$ cells/ml である。一方、従属栄養海洋細菌の培養にしばしば用いられる ZoBell 2216E 培地による培養計数法では、その計数値が上記の数値のわずか0.1%にも達しないことが多く、この現象は特に外洋海域で顕著である。しかし、このような場合であっても、種々の直接生菌

計数法や放射性同位元素標識をした有機基質によるラジオオートグラフィーなどの知見からは、多くの細菌粒子に呼吸活性や従属栄養活性が保持されていることが示されている^{3,7,24)}。そのため、海水中には「生きているけれども培養できない (Viable but nonculturable; VBNC)」海洋細菌が存在していると考えざるを得ない。また、現在の海洋細菌の生態学的研究では、海洋細菌の多くは VBNC であることを前提に議論が進められる事が多くなっている。

この VBNC 海洋細菌の実態については、これま

でに多くの議論がなされてきたが、その内容は以下の二点に集約されるであろう。一つは「VBNC 海洋細菌とは、通常の培地でも培養できる海洋細菌が、何らかの環境ストレスによって一時的に培養不可能になっている状態 (VBNC state) である。」という解釈であり²³⁾、もう一つは「VBNC 海洋細菌とは、これまでの海洋細菌の分離・培養法では培養できない、新奇な細菌集団 (noncultured bacteria) である。」という解釈である¹¹⁾。前者については、ある種の *Vibrio* 属細菌が低温ストレスによって培養不可能な状態になるなどの知見²⁹⁾によって支持され、後者については、海水中の細菌粒子から直接抽出されたゲノム DNA をテンプレートとして PCR (polymerase chain reaction) によって増幅された 16S rRNA 遺伝子の中に、系統学的に未知で新奇な細菌遺伝子が多数存在することによって支持される^{4,10,25)}。おそらく海洋環境でみられる VBNC 海洋細菌の中には両者が混在していると思われるが、今後、前者については VBNC 化へのメカニズムや VBNC 状態を特徴づける生理学的な性質などについてより詳細な知見が必要であろうし、後者については、培養法を工夫して、いまだその遺伝子情報の一部しか知られていない noncultured bacteria を分離・培養する努力が必要なのではないかと思われる。

2. 海洋細菌の飢餓生残 (starvation survival) と VBNC state

従属栄養細菌が増殖するために必要な種々の栄養塩が充分ではない状態、いわゆる低栄養ストレスは、多くの海洋環境で普通に存在する。とりわけ、外洋海水中の溶存態有機物濃度は一般にきわめて低く、炭素量にして高々数 mg C/L である。このような低栄養環境に従属栄養細菌がどのように適応しているのかを考えるうえで、多くの海洋細菌分離株にみられる飢餓生残能力は重要である。1970年代後半からの Morita らや Kjelleberg らによる、*Vibrio* 属などの細菌純粋分離株を用いた一連の研究から、まったく有機基質を添加しない飢餓環境下であっても複数の海洋細菌は長期間 viability を失わずに生残すること、さらにこの過程ではその初期段階で細胞の小型化などの形態的変化のみならず、タンパク質の発現レベルでの適応反応が見られることなどが明らかになった^{14,17,19)}。また、飢餓状態の細菌集団

では、寒天平板培地による培養計数値よりはるかに多い数の細菌細胞で呼吸活性が維持されているとの報告^{14,21)}もあり、有機栄養基質の枯渇により引き起こされる VBNC state の存在を示唆する。以上の知見からは、海洋環境における低栄養ストレスにより、多くの海洋細菌が飢餓生残状態になり、その過程で何らかの理由から VBNC 細胞化することも考えられる²⁰⁾。

しかし、飢餓生残細胞に関するこれまでの研究は、多くの場合、自然状態ではあり得ないような高濃度の細菌細胞密度 (10^8 cells/ml 以上) での培養系で実験が行われており、実際の海洋環境で通常みられる細菌細胞密度 (10^6 cells/ml 以下) で同様の現象が起こっているかどうか判断するのは早計かもしれない。また、多くの海洋細菌分離株で、全く有機基質を添加しない海水のみの培養系であっても 10^6 cells/ml 程度には増殖することが観察されており^{6,13,32)}、実際の海洋環境で細菌群集が常にゆっくりとした速度で増殖している (slow growing) 可能性がある。さらに外洋海水から分離された *Alteromonas* 属の海洋細菌で、低栄養条件下で slow growing (oligotrophic growing) している時の細菌細胞から、高栄養条件下での速い増殖 (eutrophic growing) 時や飢餓生残時の細菌細胞とは明確に異なる生理学的特徴 (基質取り込みおよび利用能等) や、特異的に発現量が増加するタンパク質およびその遺伝子が見いだされている¹⁸⁾。現在のところ、実際の海洋環境中の個々の細菌細胞が starvation survival の状態にあるのか、あるいは oligotrophic growing しているのか区別することは困難であるが、将来何らかの特徴をプローブとした手法が開発されれば、VBNC 海洋細菌の生理学的特徴についてより多くの情報が得られるものと考えられる。

3. 系統学的に新奇な noncultured bacteria

近年の分子生物学の進展により、海洋環境中に存在する細菌粒子画分から直接ゲノム DNA を抽出し、それをテンプレートにして PCR 増幅した特定の遺伝子、多くの場合 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA)、を大腸菌にクローニングして得た 16S rDNA clones の群集組成を調べる事で、培養・分離の段階を経ずに海洋細菌の群集組成を解析する手法が開発されている¹¹⁾。その結果、海洋環境には、これまで常法で分離されてきた細菌種とは系統学的

に異なる細菌の遺伝子が多数存在している可能性が示唆された⁴⁾。細菌細胞としての実体がまだ無い、遺伝子情報からのみ存在が認められるこのような細菌を「noncultured bacterial clones」とする。noncultured bacterial clones の存在は、VBNC 海洋細菌の多くが、これまでの培養計数法では検知できない、新奇で特殊な細菌群であり、既知の細菌が VBNC 化したものではないことを示唆する。また、海水中のリボゾーム RNA を標的としたハイブリダイゼーション実験などから、ある種の noncultured bacterial clones が海洋環境で優占的に存在している可能性が示唆されている⁹⁾。しかし、そのような例外的な実験例を除き、環境中での noncultured bacterial clones の優占度は、遺伝子の PCR 増幅量に由来しており、細菌粒子からの DNA 抽出効率や PCR 増幅効率の偏りによって結果的に noncultured bacterial clones の優占性が過剰に高く評価されているのではないかと、との指摘もある^{22,27)}。また、ある海水試水から得た noncultured bacterial clones の種組成を、同じ海水試料から通常の手法で培養・分

離した海洋細菌の種組成と系統学的に比較した研究では、両者は全く異なるという知見²⁸⁾が得られる一方、それとは正反対の結果²⁹⁾も報告されている。このような現象が海域特異的なものなのか、あるいは実験者の経験や実験環境の違いによるものなのか、今後検討が必要であろう。いずれにしても noncultured bacterial clones の生態系での重要性を評価するには、これらの未知の細菌を何らかの方法で生きたまま分離する必要があると思われる。

4. 低栄養細菌の分離

これまでに海洋細菌の培養・分離に常用されてきた ZoBell 2216E 培地などには、海水中の有機物濃度と比較して、きわめて高濃度（炭素量にして数 g/L）のペプトンが添加されている。このような高濃度の有機物培地が、低栄養な海洋環境に高度に適応した海洋細菌の増殖に対して阻害的に働くのではないかと考えから、通常細菌用培地を希釈した低濃度有機物培地やまったく有機基質を添加しない

Fig. 1. Final cell yields of five obligate oligotrophs (KI89A, KI89B, KI89C, KI89D and KI89E) and a facultative oligotroph (KE10) in different concentrations of peptone added.

Dotted lines indicates inoculum cell densities.

海水培地などの種々の低栄養培地が考案され、海洋細菌の培養・計数に応用されてきた^{1,5,12)}。また、このような低栄養培地で増殖可能な細菌を「低栄養細菌 (oligotrophs)」と定義することができる。ただし前述のように、通常の手法で得られた海洋細菌であっても、その多くはまったく有機基質を添加しない海水培地中でもある程度の増殖を示すことが最近明らかになったため、残念ながらその定義はいまいである。我々も、5 g/L のペプトンを含む高濃度ペプトン培地 (ST 培地, ZoBell 2216E 培地に相当する) を 1/10000 倍希釈した低濃度ペプトン培地 (ST10⁻⁴ 培地) を調製し、各地の海域で MPN (most probable number) 法により海洋細菌の計数を行ったところ、通常の細菌用培地による培養計数値よりも数倍から数千倍高い培養計数値が得られ、その傾向は比較的環境中の有機物が豊富な沿岸域よりもきわめて低栄養な外洋域で強かった^{8,13)}。また、この培地から分離された細菌の大部分は、分離後も ST 培地では増殖できず (Fig. 1)、常法では nonculturable であると考えられ、暫定的に偏性低栄養細菌 (obligate oligotrophs; OO) とした。一方、ST 培地でも増殖可能な低栄養細菌は暫定的に通性低栄養細菌 (facultative oligotrophs; FO) とした。OO は海水中で普通にみられる細菌粒子と形態的に非常に類似した小型の細菌であり、その増殖速度や従属栄養活性も実際の海洋細菌群集のそれと類似していることから^{13,30,31)}、海洋の VBNC 細菌の一部がこれら OO である可能性は高い。

5. 偏性低栄養細菌の系統分類学的位置づけ

低栄養培地を用いて分離した低栄養細菌は、分離当初はしばしば高濃度有機物培地では増殖できない、いわゆる偏性低栄養性 (obligate oligotrophy) であることが複数の研究者によって報告されている^{1,5,6,13)}。この偏性低栄養性は VBNC 海洋細菌を考えるとときに興味深い、これまでほとんど研究がなされていない。その原因として、多くの場合、研究室で継代培養している間に当初見られた偏性低栄養性が失われること²⁶⁾、あるいは、培地基質を変えることで偏性低栄養性が失われることがあること¹⁶⁾があげられる。我々も、分離当初は偏性低栄養性であったにも関わらず継代培養中に通性低栄養細菌化した細菌分離株 (adapted facultative oligotrophs; AFO) をこれまでにいくつか得ている。しかし、

我々が分離した偏性低栄養細菌 (OO) 株の多くは、長期間の培養にもかかわらずその偏性低栄養性は維持されており、また調べた限りでは、その偏性低栄養性を失う培地基質は存在しない。そこで、これら OO 株の 16S rDNA を解析し、既知の海洋細菌や noncultured bacterial clones、そして OO と同時に分離された通性低栄養細菌 (FO) との系統関係を解析することによって、通常の方法では VBNC 海洋細菌である OO の系統分類学的位置づけを行った。その結果、同時に分離した OO と FO であっても、両者は系統学的に明確に異なり、AFO は OO よりも FO に近縁であること、また様々な海域から分離された OO は、系統樹上、いくつかのクラスターにまとまり、いずれも既知の海洋細菌とは系統学的には遠縁であることが明らかになった (Fig. 2)。以上のことから、VBNC 海洋細菌の中には、通常の海洋細菌用培地で culturable でありながら、なんらかの原因 (おそらく低栄養ストレス) によって、一時的に VBNC state になった AFO のような細菌が存在すると同時に、それらとは分子系統学的に異なる新種の細菌も存在し、OO もそれに該当すると考えられる。

以上のように、低濃度ペプトン培地 (ST10⁻⁴ 培地) で分離された OO はこれまでに未知の細菌であることが明らかとなったが、不思議なことにすべてが proteobacteria γ 群に属した。一方、noncultured bacterial clones では γ 群以外に α 群や β 群に属するものが報告されており⁴⁾、また、OO に近縁な noncultured bacterial clone もデータベース中には見いだされなかった。微量ではあっても、ST 10⁻⁴ 培地に加えられているペプトンがある種の海洋細菌の増殖に対して阻害的に働いている可能性があるため、現場海水をろ過滅菌しただけの基質無添加海水培地を調製し、新たに OO の計数・分離を行ったところ、ST10⁻⁴ 培地による培養計数値より高い計数値が得られ、さらに分離した OO には α 群および β 群に属すると思われる新奇な細菌が存在した。しかもその中にはデータベース中の noncultured bacterial clone と近縁な OO も存在した¹⁵⁾。以上のことから、OO の分離に用いる低栄養培地や培養条件を工夫することで、海洋の未知の VBNC が培養可能になるのではないかと思われる。

Fig. 2. Phylogenetic tree inferred from partial sequences of 16S rDNA (58–657, *E. coli* numbering) showing relationships of obligate oligotrophs (OO), facultative oligotrophs (FO), and adapted FO (AFO), to well-known bacteria and "noncultured bacteria clones" in GenBank database¹⁵⁾.

The scale bar shows ten nucleotides substitution per 100 nucleotides. POO, OO isolates from the western Pacific Ocean; KI, OO isolates from Japan Sea; PFO, FO isolates from the western Pacific Ocean; PAFO, AFO isolates from the western Pacific Ocean; SAR, noncultured bacterial clones in database. The percentage of 100 bootstrap resampling that support each topological element is indicated. Bootstrap values below 50% are not shown.

6. 高濃度ペプトン負荷による OO の増殖阻害

低栄養培地によって分離された OO は、今までは VBNC と認識されてきた細菌の一部である可能

性がある。なぜこれらの細菌が通常の培地では non-culturable であるかを明らかにすることは、VBNC 海洋細菌の nonculturability を理解するうえでも意義があると思われる。そこで、高濃度ペプトン存在下での、数株の OO の viability の変化をしらべた

ところ、いずれも数日の間に *viability* が急激に減少し、死滅していることが明らかになった。ペプトンの主成分であるアミノ酸を高濃度負荷した場合、細菌株によって多少の違いはあるものの、いくつかのアミノ酸で *OO* を死滅させる効果がみられた。検討したすべての *OO* 株に対して死滅効果を持つアラニンは、低濃度では *OO* によって利用されその増殖を助けるものの、20 mgC/L 以上の濃度では、添加後24時間以内に高分子合成能を減少させ、やがて *OO* を死滅させた。この時、細菌によって取り込まれたアラニンは、他の物質に変換されることなくアラニンの状態で細胞内に多量に蓄積していた。アミノ酸代謝の結果の有機酸の蓄積および pH の低下や、アミノ酸代謝のフィードバック阻害の根拠は見られなかったことから、おそらく *OO* に特徴的な未知の代謝・増殖阻害機構があるものと推定される。また、増殖阻害を引き起こすアミノ酸は低濃度では *OO* によって効果的に利用されていることから、このような *OO* 特有の死滅現象は、*OO* が低栄養環境下で、乏しい有機基質を効果的に利用できるよう適応した結果生じたものではないかと考えられる。

5. 終わりに

生きているけれど培養できない(状態の)細菌(*viable but nonculturable bacteria*)という語は、きわめてあいまいな表現である。なぜならば「培養」はきわめて人為的であり、*culturability* は培地や培養条件でかなり左右されるうえ、細菌の場合「生死」の区別が困難だからである。それにも関わらず、海洋微生物生態学において、VBNC state あるいはVBNC 細菌が無視できないのは、通常の方法で分離した海洋細菌を実験室内で好適な条件で培養した時の対数増殖期の細菌細胞から得られる情報からは、低栄養な実際の海洋環境中で行われている海洋細菌の動態をうまく説明できないからであろう。しかし、現在までに VBNC 海洋細菌に関して十分な理解が得られたとは考えられず、今後とも VBNC 海洋細菌の実態を生理・生化学の面から、また培養困難な VBNC を分離する工夫を通して明らかにする必要があると思われる。

文 献

- 1) Akagi, Y., N. Taga and U. Simidu. 1977. Isolation and distribution of oligotrophic marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **23**: 981-987.
- 2) Benlloch, S., R. Francisco and Antonio, J.M. 1995. Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* **18**: 267-280.
- 3) Brayton, P., M. Tamplin, A. Huq and R.R. Colwell. 1987. Enumeration of *Vibrio Cholerae* O1 in Bangladesh waters by fluorescent-antibody direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2864-2865.
- 4) Britschgi, T.B. and S.J. Giovannoni. 1991. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1707-1713.
- 5) Button, D.K., F. Schut, P. Quang, R. Martin and B.R. Robertson. 1993. Viability and isolation of typical marine oligobacteria by dilution culture: theory, procedures and initial results. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 881-891.
- 6) Carlucci, A.F., S.L. Shimp and D.B. Craven. 1986. Growth characteristics of low-nutrient bacteria from the north-east and central Pacific Ocean. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**: 1-10.
- 7) Douglas, D.J., J.A. Novitsky and R.O. Fournier. 1987. Microautoradiography-based enumeration of bacteria with estimates of thymidine-specific growth and production rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **36**: 91-99.
- 8) Eguchi, M. and Y. Ishida. 1990. Oligotrophic properties of heterotrophic bacteria and in situ heterotrophic activity in pelagic seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**: 23-30.
- 9) Field, K.G., D. Gordon, T. Wright, M. Rappé, E. Urbach, K. Vergin and S.J. Giovannoni. 1997. Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 63-70.
- 10) Fuhrman, J.A., K. McCallum and A.A. Davis. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**: 148-149.
- 11) Giovannoni, S.J., T.B. Britschgi, C.L. Moyer and K.G. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 63-65.
- 12) Ishida, Y., M. Eguchi and H. Kadota. 1986. Existence of obligately oligotrophic bacteria as a dominant population in the South China Sea and the West Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **30**: 197-203.
- 13) Ishida, Y., K. Fukami, M. Eguchi and I. Yoshinaga. Strategies for growth of oligotrophic bacteria in the

- pelagic environment, in "Recent advances in microbial ecology", eds. by T. Hattori et al. Japanese Scientific Society Press, Tokyo, 1989, pp. 89–93.
- 14) Kurath, G. and R.Y. Morita. 1983. Starvation-survival physiological studies of a marine *Pseudomonas* sp. Appl. Environ. Microbiol. **45**: 1206–1211.
- 15) 片野坂徳章. 1999. 海洋性低栄養細菌の 16S rRNA 遺伝子情報を用いた系統分類学的解析. 京都大学農学研究科博士論文.
- 16) Martin, P. and R.A. Macleod. 1984. Observation on the distinction between oligotrophic and eutrophic marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **47**: 1017–1022.
- 17) Mården, P., A. Tunlid, K. Malmcrona-Friberg, G. Odham and S. Kjelleberg. 1985. Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. Arch. Microbiol. **142**: 326–332.
- 18) 前田俊道. 1996. 低栄養環境における海洋細菌の増殖戦略の分子生物学的研究. 京都大学農学研究科博士論文.
- 19) Morita, R.Y. Bioavailability of energy and the starvation state, in "Starvation in bacteria" ed by S. Kjelleberg. Plenum Press, New York and London, 1993, pp. 1–23.
- 20) Oliver, J., L. Nilsson and S. Kjelleberg. 1991. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 2640–2644.
- 21) Oliver, J.D. 1993. Formation of viable but nonculturable cells, in "Starvation in bacteria" ed by S. Kjelleberg. Plenum Press, New York and London, 1993, pp. 239–272.
- 22) Reysenbach, A.L., L.J. Giver, G.S. Wickham and N.R. Pace. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 3417–3418.
- 23) Roszak, D.B. and R.R. Colwell. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol. Rev. **51**: 365–379.
- 24) Roszak, D.B. and R.R. Colwell. 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 2889–2983.
- 25) Schmidt, T.M., E.F. DeLong and N.R. Pace. 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. J. Bacteriol. **173**: 4371–4378.
- 26) Schut, F., E.J. Vries, J.C. Gottschal, B.R. Robertson, W. Harder, R.A. Prins and D.K. Button. 1993. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture : Growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 2150–2160.
- 27) Suzuki, M.T. and S.J. Giovannoni. 1996. Mechanism of bias in the amplification of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 625–630.
- 28) Suzuki, M.T., M.S. Rappe, Z.W. Haimberger, H. Winfield, N. Adair, J. Stobel and S.J. Giovannoni. 1997. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 983–989.
- 29) Wolf, P.W. and J.D. Oliver. 1992. Temperature effects on the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol. Ecol. **101**: 33–39.
- 30) Yoshinaga, I., K. Fukami and Y. Ishida. 1991. Comparison of DNA and protein synthesis rates of bacterial assemblages between coral reef waters and pelagic waters in tropical ocean. Mar. Ecol. Prog. Ser. **76**: 167–174.
- 31) Yoshinaga, I. and Y. Ishida. 1992. Strategy of oligotrophic growth of pelagic marine bacteria. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. **37**: 95–100.
- 32) Yoshinaga, I., T. Kawai and Y. Ishida. 1997. Analysis of algicidal ranges of the bacteria killing the marine dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* isolated from Tanabe Bay, Wakayama Pref., Japan. Fish. Sci. **63**: 94–98.