日本沿岸海域に分布する好気性コラーゲン分解細菌—II

単離細菌の分類

笠 間 憲太郎・北 御 門 学

(1978 年 2 月 23 日受理)

Aerobic Collagenolytic Bacteria in the Coastal Area of Japan—II
Classification of BacteriaKentaro KASAMA*¹ and Manabu KITAMIKADO*²

Two hundred and thirty-six isolates of aerobic collagenolytic bacteria from the coastal areas of Japan were classified according to the criteria of the 8th edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The great majority of these isolates (222 strains) were Gram negative, oxidase positive, single polar flagellation, asporogenous rod, and carbohydrate metabolism fermentative, produced acid but no gas from glucose, and were sensitive to 2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine and facultatively anaerobic. These morphological and biochemical characteristics suggested an assignment to genus *Vibrio*. The representative 10 strains which have high productivity of collagenolytic enzyme seem to belong to a species *Vibrio parahae-molyticus* (biotype 2) or to its allies. The members of genus *Vibrio* predominate among the collagenolytic bacteria which are distributed in natural coastal areas. The characteristics of several isolates (6 strains) were Gramnegative, oxidase positive, single polar flagellation, asporogenous rod, but carbohydrate metabolism oxidative, and were not sensitive to 2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine and aerobic, suggesting their assignment to genus *Pseudomonas*. The rest (8 strains) showed different characteristics, and could not be identified. The collagenolytic enzyme productivity of the isolates of genus *Pseudomonas* and of the unknown group was of no account.

前報¹⁾で日本沿岸海域の海水、海底砂泥、プランクトン、海産動植物には好気性（通性嫌気性を含む）コラーゲン分解細菌が存在していることを明らかにし、多数の分解細菌を単離したことを報告した。本報ではこれらの単離細菌を分類した結果について報告する。

実験材料および方法

供試細菌 前報¹⁾でコラーゲン分解細菌として単離した 236 株の細菌である。

細菌の同定法 Bergey's Manual 第 8 版²⁾記載の同定基準によった。また BAIN と SHEWAN の同定図式³⁾を参考にした。形態、運動性、グラム染色性は光学顕微鏡で観察し、オキシダーゼ試験は KOVACS の方法⁴⁾、炭水化物代謝 (O/F medium) は HUGH-LEIFSON の方法⁵⁾、2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine (*Vibrio*-

static agent 0/129) に対する感受性は SHEWAN らの方法⁶⁾によった。その他の生理試験は通常法によった。なお、成育温度試験、塩分要求試験などの特殊な場合を除いて、培地の食塩濃度は 3% になるように調整し、培養は 25°C で行なった。また、DNA の GC 含量は WANG と HASHAGEN の方法⁷⁾によつて測定し、一部の細菌のべん毛観察には電子顕微鏡を使用した。

使用薬品 前報¹⁾と同じ

実験結果

単離細菌の属組成 全単離細菌 236 株中 228 株 (96.6%) という大多数がグラム陰性、オキシダーゼ陽性、単極毛を有する非孢子形成の桿菌であつた。これらの細菌はさらに二つの group に分けられた。すなわち、222 株の細菌は第 1 の group に属し、炭水化物代謝は

*¹ 九州大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kyushu University 46-04, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan).

現所属 長崎大学水産学部 (Present address: Faculty of Fisheries, The University of Nagasaki, Bunkyo-machi 852, Japan).

*² 九州大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kyushu University 46-04, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan).

発酵的, グルコースから酸を産生し, ガスは非産生, Vibriostatic agent 0/129 に対して感受性があり, *Vibrio* 属の細菌群と考えられた。コラーゲン分解酵素産生能の大きい細菌は, 前報¹⁾ で示した代表的な酵素産生株であ

る 10 株の細菌も含めて, すべてこの group に属していた。第 2 の group に属する細菌は少なく, わずかに 6 株のみであり, 炭水化物代謝は酸化的, Vibriostatic agent 0/129 に対する感受性はなく, *Pseudomonas* 属

Table 1. Genera assignment of 236 isolates of collagenolytic bacteria

Group	Main characteristics	Conceivable genus	Number of isolates
Group 1	Gram negative, asporogenous rod, motile by a single polar flagellum, carbohydrate metabolism (O/F medium) fermentative, catalase positive, oxidase positive, acid but no gas from glucose, sensitive to 2, 4-diamino-6, 7-diisopropyl pteridine, facultative anaerobic	<i>Vibrio</i>	222 (94.1%)
Group 2	Gram negative, asporogenous rod, motile by a single polar flagellum, carbohydrate metabolism (O/F medium) oxidative, catalase positive, oxidase positive, not sensitive to 2, 4-diamino-6, 7-diisopropyl pteridine, aerobic	<i>Pseudomonas</i>	6 (2.5%)
Group 3	Various characteristics	Unknown	8 (3.4%)

Table 2. Morphological, cultural and biochemical characteristics of representative ten isolates*

Morphology		Biochemistry	
Trait	Type	Test	Reaction
Form	Rod with rounded ends	Lecithinase (egg yolk)	+
Size	0.5 to 0.8 by 1.0 to 2.0 μ m	Hydrogen sulfide production	-
Motility	Motile	Kovacs' oxidase	+
Flagellum	A single polar flagellum	Catalase	+
Spore	Non-forming	Acid from arabinose	-
Gram stain	Negative	glucose	+
Culture		inositol	-
		mannitol	+
		mannose	+
		salicin	-
		sucrose	+
Biochemistry		Starch hydrolysis	+
		Growth without added NaCl	-
		in 7.0% NaCl	+
		in 10.0% NaCl	+
		Growth at 5°C	-
Indole production	+	at 37°C	+
		at 42°C	+
Methyl red	-	Møller's media:	
Voges-Proskauer	+	Arginine-alkaline	-
Citrate utilization	+	Lysine decarboxylase	+
Sensitivity to 2, 4-diamino-6, 7-diisopropyl pteridine (saturated)	+	Ornithine decarboxylase	+ or -**
Sensitivity to novobiocin (2 μ g)	+	Luminescence	-
Gelatin liquefaction	+	GC ratio of DNA	42-46%
Casein hydrolysis	+		
Tween 80 hydrolysis	+		

* See Table 2 in the previous paper¹⁾.

** Six isolates (strains No. D-99, D-8, D-65, D-100, D-97, D-106), positive; Four isolates (strains No. B-92, B-25, C-93, B-42), negative.

Fig. 1. Electron micrograph of No. 92 strain of *Vibrio* sp. Cr shadowing.

の細菌群と考えられた。この group の細菌のコラーゲン分解酵素産生能は小さく、第1の group の最下位のものと同程度に過ぎなかつた。全単離細菌の中にはこの他に、8株ではあつたが形態や生理的諸性質が不明瞭なために同定できない group があつた。しかし、この group の細菌のコラーゲン分解酵素産生能はいずれも小さく、前記第2 group のものと同程度であつた。

以上の結果をまとめて Table 1 に示す。

***Vibrio* 属細菌の諸性質** 本属の細菌が日本沿岸海域に分布するコラーゲン分解細菌の優占菌であると考えられるので、前報¹⁾で示したコラーゲン分解酵素産生能が大きい上位10株の細菌を対象として、諸性質を詳細に検討した。その結果は、供試した10株の細菌間でオルニチン脱炭酸反応が6株は陽性であり4株は陰性という不一致が認められたが、検討した範囲内で、その他の諸性質はすべて同一であつた。これらの細菌の諸性質を Table 2 に示し、コラーゲン分解酵素産生能が全単離細菌中最大である B-92 株の電頭像を Fig. 1 に示す。

考 察

本研究の結果から、日本沿岸海域に分布する好気性(通性嫌気性を含む)コラーゲン分解細菌は *Vibrio* 属と *Pseudomonas* 属との細菌であり、しかもその大多数が前者であると推察される。コラーゲンは海域や陸上の種々の動物体に含まれ、自然界に広く存在しているたん白質であるにもかかわらず、沿岸海域におけるその分解細菌が主として *Vibrio* 属の細菌に限定されることは、陸上の分解細菌が主として *Clostridium* 属のものに限定される³⁾ことを考え合わせると、興味深いことである。

単離細菌中、コラーゲン分解酵素産生能の大きい上位10株の細菌を選んで諸性質を検討した結果は、オルニチン脱炭酸反応性を除いて、10株とも同一の性質を示

した。オルニチン脱炭酸反応陽性の6株の諸性質は、SHEWAN と V'ERON の執筆になる Bergey's Manual 第8版²⁾記載の *Vibrio parahaemolyticus* (biotype 2) の諸性質と完全に一致しているので、この species の細菌であると決定できそうである。しかし、オルニチン脱炭酸反応陰性の4株の細菌には疑問が残る。

Bergey's Manual 第8版²⁾には *V. parahaemolyticus* 以外にも *Vibrio* 属の species として *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *V. fischeri*, *V. costicola* の4 species の記載がある。しかしながら、オルニチン脱炭酸反応陰性の上記4株の単離細菌を *V. parahaemolyticus* 以外の species に帰属させることは無理なようである。*V. cholerae* は単離細菌のように培地中に食塩の添加がなければ増殖できない細菌ではないし、広範囲の日本沿岸に四季を通じて分布している細菌がコレラの病原菌である筈もない。単離細菌と *V. anguillarum* とは好塩性のみならずクエン酸塩利用、アルギニン培地のアルカリ化などの性質に相違がある。*V. fischeri* は好塩細菌であり、生息場も海水中と記載されているが、インドール産生、メチルレッド反応、V.P. 反応、クエン酸塩利用、アルギニン培地のアルカリ化などの性質において、単離細菌とは相違があり過ぎる。残る1 species である *V. costicola* も好塩細菌であるが、インドール産生、クエン酸塩利用、カゼインとデンプンの加水分解、アルギニン培地のアルカリ化、リジン脱炭酸反応などの多くの性質に相違がある。結局、オルニチン脱炭酸反応陰性の4株の細菌も Bergey's Manual 記載の5 species の中でも *V. parahaemolyticus* (biotype 2) に最も近似した性質を有すると思えざるをえない。BAIN と SHEWAN の細菌同定に関する手引書³⁾のように、*Vibrio* 属細菌のアミノ酸脱炭酸反応に関連しては、アルギニン培地のアルカリ化とリジン脱炭酸反応のみを取り上げ、オルニチン脱炭酸反応の記載がない著書もあり、この4株の単離細菌も *V. parahaemolyticus* biotype 2 か、あるいはその近縁細菌と考えるのが妥当なようである。ただし、これらの細菌のオルニチン脱炭酸反応性が研究室における保存期間中に変化したのかどうかは不明である。

V. parahaemolyticus biotype 2 は食中毒原因細菌の一つである biotype 1 の近縁細菌であるが、10% 食塩添加培地中での増殖、メチルレッド反応、V.P. 反応、アラビノースとシュクロースからの酸産生などの性質の相違によつて型別され、食中毒とは無関係という意見が多い⁴⁾。日本沿岸海域における分布も調査され、申ら¹⁰⁾は本型の細菌は夏季の沿岸海域に多数出現してくることを示唆している。本研究においても、コラーゲン分解細菌は前報¹⁾のように夏季の沿岸海域に多数認められた。

本研究においては単離細菌の分類上の位置に関する詳

細な検討は代表的な 10 株の細菌についてのみ行ない、大多数のものについては行っていない。しかしながら、*Vibrio* 属の単離細菌のすべてが好塩性であり、寒天培地上で swarming の性質を有し、その他の肉眼的観察による諸性質も同一であるから、大多数の単離細菌は Table 2 に示した 10 株の細菌と同 species の細菌であるか、またはその近縁の細菌であろうと推察される。

文 献

- 1) 北御門 学・笠間憲太郎：日水誌, **44**, 883-886 (1978).
- 2) R. E. BUCHANAN and N. E. GIBBONS: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974).
- 3) N. BAIN and J.M. SHEWAN: in "Identification methods for microbiologists" (ed. by B.M. GIBBS and D.A. SHAPTON), Part B, Academic Press, London and New York, 1968, pp. 79-84.
- 4) N. KOVACS: *Nature*, **178**, 703 (1956).
- 5) R. HUGH and E. LEIFSON: *J. Bacteriol.*, **66**, 24-26 (1953).
- 6) J.M. SHEWAN, M. HODGKISS, and T. LISTON: *Nature*, **173**, 208-209 (1954).
- 7) S. Y. WANG and J.M. HASHAGEN: *J. Mol. Biol.*, **8**, 333-340 (1964).
- 8) A. NORDWIG: *Adv. in Enzymol.*, **34**, 155-205 (1971).
- 9) 坂崎利一：食品衛生研究, **14**, 76-79 (1964).
- 10) 申 錫雨・堀江 進・奥積昌世・小林義久：日水誌, **42**, 1041-1053 (1976).