



Title	腸炎ビブリオ菌体蛋白のアミノ酸組成に関する研究
Author(s)	高木, 光造; TAKAGI, Mitsuzō; 飯田, 優 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 18(3), 271-276
Issue Date	1967-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23327
Type	departmental bulletin paper
File Information	18(3)_P271-276.pdf



腸炎ビブリオ菌体蛋白のアミノ酸組成に関する研究

高木 光造*・飯田 優*

Amino Acid Composition of the Cell Proteins of *Vibrio Parahaemolyticus*

Mitsuzō TAKAGI and Atsushi IIDA

Abstract

Vibrio parahaemolyticus is well known to be a organism causing food poisoning in Japan. It has appeared that the high pathogenic potency is not due to the action of biotype 2 but mostly to biotype 1. Furthermore, the pathogenic characteristics are presumed to be caused by some constituents of the cellular tissues of *V. parahaemolyticus*.

In order to determine the relation of the pathogenicity and the chemical constituents of *V. parahaemolyticus*, the authors first determined the relative amounts of amino acids in the hydrolysates of the cell protein of the two biotypes 1 and 2, according to the following procedure.

A conical flask containing an aliquot volume of 3% sodium chloride nutrient broth was inoculated with bacteria and incubated at 37°C using a magnetic stirrer. The bacteria bred were centrifuged, washed with diluted artificial sea water, suspended in a small amount of water, and then the cells were disintegrated by the freezing and thawing method. After being heated in the boiling water bath, the disrupted cells were washed with 75% ethyl alcohol thoroughly, absolute alcohol, and ether finally. In this way, the solid portion of the cells was dried in the dessicator and used as bacterial cell proteins in this study.

Dried cell proteins were hydrolyzed with 6N hydrochloric acid for 22 hrs. at 110°C and the amino acid composition was determined with a Hitachi Amino Acid Analyzer Model KLA-3. The results may be summarized as follows. No remarkable difference was found in the amino acid patterns of protein of the two biotypes. The main constituents of the protein were found to be glutamic acid, aspartic acid, alanine, leucine, lysine, and valine. The detection of tryptophan was not carried out in this study. Some unknown ninhydrine positive substances were found in both biotypes 1 and 2.

緒 言

海産物から分離される細菌のなかには海水に由来する比較的食塩濃度の高い培地に発育する菌株が多数存在している。しかし、それら細菌の毒性、とくにヒトに対する病原性については従来余り注意が払われなかった。

しかるに1953年、一群の好塩性細菌がシラス中毒の原因菌として指摘され¹⁾²⁾、さらに1956年、滝川ら³⁾⁴⁾によりその生化学的性状が明らかにされてから、次第に各方面より注目されるようになった。たまたま、太平洋沿岸各地に惹起したアジに起因した集団食中毒の原因菌が本菌群と同一であること

* 北海道大学水産学部食品化学第二講座

が証明され、にわかにその重大性が認められて着着本菌群の検索が進められた結果、本菌群は広く海洋に分布しており、とくに近海魚の体表に付着し、ヒトへの感染発症を起すものとして、多数の研究⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾が発表され、その間厚生省においても重点調査事項として、1961年来、全国的な規模のもとに発生分布の確認と臨床的、細菌学的、免疫学的調査による発生原因ならびに発生機序の究明を行ない、1963年、学名として *Vibrio parahaemolyticus* (Fujino) Sakazaki *et al.*, また和名として“腸炎ビブリオ”と呼称することに決定し、現在なお各方面で研究が続けられている。

ことに最近、腸炎ビブリオの病原性について実験的検討がなされ、善養寺¹²⁾¹³⁾は De-test¹⁴⁾を応用し、この実験範囲においては菌が腸管に定着増殖するメカニズムについての解明は出来なかったが、少なくとも本菌群は赤痢菌などとは異なり、腸管常在菌の影響を受けることが少なく、コレラ菌などと同様に高い起病性を有するものであり、さらに De-test における血管透過性亢進に関与する菌側の因子として高分子物質があげられている。

すなわち、腸炎ビブリオの De-test 陽性物質は菌体側にあり、細胞壁構成成分である内毒素とは別の表層成分であるとの見解がとられている。

したがって、著者らはその病原性究明の一環として、腸炎ビブリオの細胞壁構成成分を主体とする菌体蛋白の研究を行ない、その一部を明らかにした結果の概要を報告するものである。

なお、腸炎ビブリオの病原性は主に、患者株同様の O, K, 抗原をもち、且つ生物型 1 に属する菌株によるものと考えられ、生物型 2 の菌株は、患者株同様の O, K, 抗原をもつ極く一部の菌株のみが生物型 1 同様の潜在的病原性を示して、一次起炎菌となり得る場合もあるが、大部分は食中毒原因菌となり得ないと言われていることから、これら生物型 1, 生物型 2 について比較検討を行なったものである。

実 験 方 法

供試菌：供試菌株は本学部微生物学教室より分与を受けたものであり、坂崎の分類による血清型 0-5 を生物型 1 の代表とし、また滝川の血清型 12 を生物型 2 の代表として、本実験に供した。

培地：常法通り 3% 食塩加ブイオン (pH 7.4~7.5) を使用した。ただし、食塩耐容性試験用培地は食塩濃度がそれぞれ 3%, 7%, 10% のものを用いた。また、これら調製後の培地については、培養期間中にその pH 値が変動して、培地成分に由来する沈澱物が生成することも考えられるので、このことを確めるため、3.5% 塩酸と 4% 苛性ソーダを加えて pH を 3.0 から 10.0 の間に変動させて状態を観察したが、何ら濁濁することなく、また沈澱の生成もみられなかった。

食塩耐容性試験：前記 2 株について、それぞれ食塩濃度が 3%, 7%, 10% になるように調製した食塩加ブイオンを用いて食塩耐容性試験を行ない、坂崎の分類による血清型 0-5 株は食塩濃度 3%, 7% の培地に発育するが 10% の培地には発育せず、滝川の血清型 12 株は 3 種の培地に発育することによって、前者は生物型 1, 後者は生物型 2 であることを確認した。

菌の培養：接種菌は予め 3% 食塩加ブイオンで 37°C, 24 時間培養を行なった新鮮培養菌を用いた。また、大量培養においては、予めマグネチック・スターラーの攪拌子を容れた 21 容三角フラスコ中の 3% 食塩加ブイオン 11 に、前記前培養 2 白金耳を接種し、37°C でマグネチック・スターラーによる攪拌を続けて培養を行なった。

予備試験：先ず予備試験として、供試 2 菌株の対数期の検索を行なった。前記の大量培養法と同一条件で攪拌培養を行ない、適宜に培地の所定量を無菌的に採取し、これらの濁度を測定した。すなわち、採取した培地を 0.85% 食塩を含む 5% フォルマリン液の等量とよく混合し、検体培地と同一組成の培地と 0.85% 食塩 - 5% フォルマリン液との等量混合液を対照として、光電比色計 (日立製 FPW-4 型) を用い、フィルター 66 で吸光値を測定してその値を濁度とし、菌体増殖による培地の濁度と培養時間との関係を求めた。その結果、両菌株とも Fig. 2 に示す如き発育曲線が得られた。すなわち、

対数期直後は培養 24 時間と判定された。

菌体の大量培養と菌体蛋白の調製：菌体蛋白の調製法の概要は Fig. 1 に示したとおりであり、生物型 1 および生物型 2 について、前記の如く大量培養を行なった。対数期直後に於いて培養を止め、速やかに培地を遠心分離 (5,000r.p.m., 20 分間) し、菌体は 6 倍稀釈した人工海水を用いて遠沈法で洗滌を 7 回繰返し、培地成分を完全に除いた。菌体をナス型フラスコに移し、水を加えて約 10% 程度の懸濁液とし、ドライアイスと 85.5% エタノールからなる寒剤に浸して緩やかに凍結させ、つぎに 30°~40°C の温湯に浸して急激に融解する。この凍結—融解操作を 6 回以上反復して菌体を破壊し、菌体内エキス成分の完全な溶出をはかった。さらに沸騰水浴中に 10 分間浸して加熱処理を行ない、菌体蛋白を凝固させるとともにエキス成分の逸脱を容易ならしめた。ついでガラスフィルターを用いてエキス成分を濾過し、固型物は 75% エタノールで繰返し洗滌してエキス成分を除去したのち、少量の無水アルコールとエーテルで洗い、硫酸デシケーター中で乾燥、恒量化したものを菌体蛋白の試料とした。

全窒素の測定：乾燥菌体蛋白についてケールダール法で測定した。

加水分解とアミノ酸の測定：乾燥菌体蛋白 12mg を 6N 塩酸 5ml とともに封管内で 110°C, 22 時間加熱後、生成したフミン質を濾別洗滌し、濾液を減圧濃縮して塩酸を除去し、pH 2.2 のクエン酸緩衝液で 10ml に定容化して供試液とした。アミノ酸の測定は、Amberlite CG-120 を用い、日立アミノ酸分析計 KLA-3 型で行なった。

V. parahaemolyticus

incubated preliminarily in 3% NaCl nutrient broth.

inoculated to a conical flask contained an aliquot volume of 3% NaCl nutrient broth.

incubated under stirring with a magnetic stirrer for 24 hrs. at 37°C, and then centrifuged.

washed seven times with diluted artificial sea water*, suspended in a small amounts of distilled water and disrupted by the freezing and thawing method**.

heated in the boiling water for ten minutes.

washed with 75% ethyl alcohol repeatedly, absolute alcohol, and then ether finally.

dried in the desiccator.

Fig. 1. Outline of the preparation of *V. parahaemolyticus* and cell protein.

* Herbst's artificial sea water contained (per liter); NaCl 30g, KCl 0.7g, MgSO₄·7H₂O 5.4g, MgCl₂·6H₂O 0.8g, CaSO₄·2H₂O 1.3g: On being used, diluted with five volumes of distilled water.

** After being frozen by immersing in the freezing mixture which made of dry ice and 85.5% ethyl alcohol, thawed by warming suddenly up to 30°~40°C.

結果ならびに考察

まず、食塩耐容性を検査し、坂崎の血清型 0-5、滝川の血清型 12 がそれぞれ生物型 1 および 2 であることを確認した上、本試験に供した。

比濁法によって得られた生物型 1 (生物型 2 も同様の結果が得られた) の増殖曲線を Fig. 2 に示したが、その結果、培養 24 時間後に対数期直後と判定し得られた。

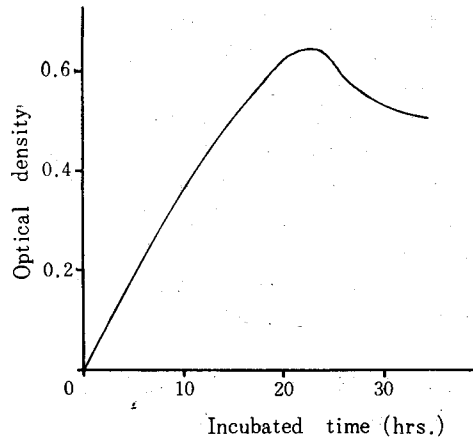


Fig. 2. Relation between the growth of the biotype 1 of *V. parahaemolyticus* in 3% NaCl nutrient broth and incubation period*.

* A conical flasks containing 200 ml of the medium was inoculated and incubated under stirring with a magnetic stirrer at 37°C, some amounts each of the medium were derived from it at adequate intervals, added to an equal volume of 0.85% NaCl solution in 5% formaline, and then optical density of the mixture was measured using a filter 66 of the Photoelectric photometer (Hitachi model FPW-4).

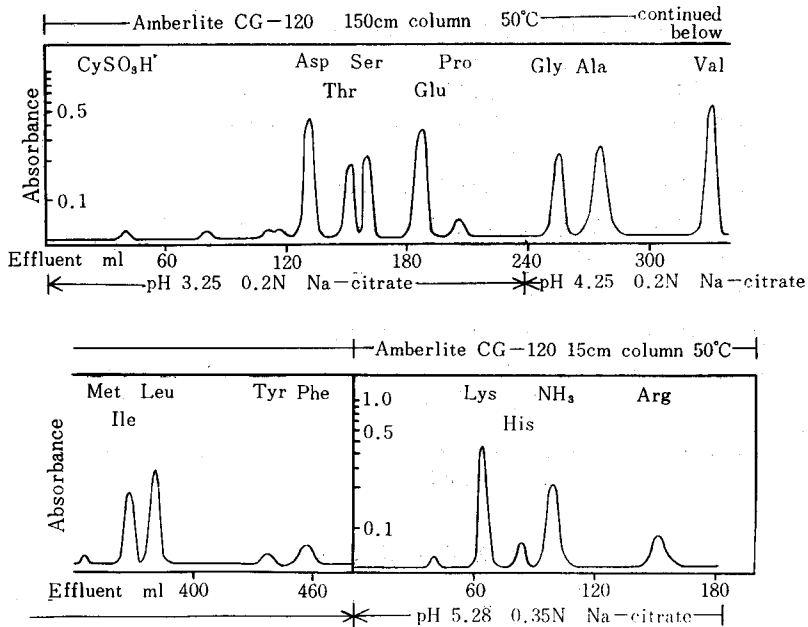


Fig. 3. Amino acid analysis of the biotype 1 of *V. parahaemolyticus* cell protein hydrolysates.

Table 1. The amino acid composition of the two biotypes of *V. parahaemolyticus*. (grams of amino acid in hydrolysates per 100g. of prepared cell protein)

Amino acid	Biotype 1 (0-5)	Biotype 2 (Takikawa's 12)
Cysteic acid	0.16	0.19
Aspartic acid	7.18	8.73
Threonine	2.29	3.94
Serine	2.01	2.78
Glutamic acid	7.94	10.62
Proline	1.01	1.27
Glycine	2.88	3.88
Alanine	4.99	6.23
Valine	3.44	5.26
Methionine	0.30	0.33
Isoleucine	2.54	4.06
Leucine	4.84	6.18
Tyrosine	1.38	2.10
phenylalanine	2.15	2.92
Lysine	4.19	5.48
Histidine	0.67	1.24
Arginine	2.96	3.69
NH ₃	1.20	0.90
Total-N g per 100g of dried matter	11.44	12.85
N recovered (%)	70.54	79.93

つぎに、24時間培養の菌体について菌体蛋白構成アミノ酸の測定を行なったが、その結果はそれぞれ Fig. 3 と Table 1 に示した。

Table 1 によると生物型別によるアミノ酸組成のいちじるしい差はみられず、両菌株の組成は類似していたが、生物型2は全窒素および各アミノ酸含量が僅かに多かった。各アミノ酸のうちで、グルタミン酸が最も多く、全アミノ酸の8~11%、アスパラギン酸は7~9%、アラニンは5~6%、ついでロイシン、リジン、バリンの順になっており、今回はトリプトファンは定量しなかった。また未詳のニンヒドリン陽性物質が生物型1に4種、生物型2に5種認められた。アミノ酸分析による窒素回収率は71~80%であり、貝類などの動物蛋白¹⁵⁾に比べて低い値を示したが、これは、菌体蛋白を加水分解した際にフミン質が生成したこと、また、一般に菌体細胞壁においてはアミノ糖、糖蛋白、多糖類が多いことから容易に推察できる。

要 約

1) 腸炎ビブリオの生物型1および生物型2の各1株について、菌体蛋白のアミノ酸組成を比較検討した。

2) 全窒素は乾物に対して生物型1が約11.5%、生物型2は約13%で僅かに後者が多かった。また、菌体蛋白のアミノ酸組成についても、生物型2は各アミノ酸含量が生物型1に比べて僅かに多かったが、生物型によるいちじるしい差はみられず、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、ロイシン、リジン、バリンの順に多く含有されていた。

終わりに終始御指導を賜わった本学部村田喜一教授，試料の菌株を分与下さった微生物学教室ならびに，実験に協力された藤田崧君に厚く御礼申し上げる。

文 献

- 1) Fujino, T., Okano, Y., Nakada, D., Aoyama, A. and Ueno, T. (1953). *Med. J. Ōsaka Univ.* **4**, 229.
- 2) 滝川 巖 (1956). 日本伝染病学雑誌 **30**, 439.
- 3) 滝川 巖・中橋勇次郎 (1957). 日本伝染病学雑誌 **31**, 115.
- 4) 滝川 巖・中橋勇次郎 (1958). *モダンメディア* **4**, 10.
- 5) 福見秀雄 (1956). 第11回日本公衆衛生学会総会特集号 p.11, 東京; 日本公衆衛生学会.
- 6) 小管輝昌 (1956). 日本伝染病学雑誌 **33**, 9.
- 7) 山地幸雄 (1958). 日本細菌学雑誌 **13**, 1.
- 8) Yamaji, Y., Kojima, T., Shibata, T., Ishizaki, T. and Hatta, S. (1959). *Jap. Microb.* **3**, 1.
- 9) 柳沢文徳 (1957). 日本衛生学雑誌 **12**, 3.
- 10) 田中香磨 (1960). 日本衛生学雑誌 **15**, 2.
- 11) 加藤 博・相磯和嘉 (1965). 千葉大学腐敗研究所報告 **12**, 12.
- 12) 養善寺 浩・坂井千三・寺山 武・工藤泰雄 (1963). 日本伝染病学雑誌 **37**, 195.
- 13) 養善寺 浩 (1963). 日本細菌学雑誌 **18**, 283.
- 14) De, S.N. and Chatteriji, D.N. (1953). *J. Path. Bact.* **66**, 559.
- 15) 奥村彩子・村田喜一・高木光造・大石圭一 (1966). 北大水産彙報 **17**, 147.