HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	多量のPoly-β-hydroxybutyrateを蓄積する海洋細菌について
Author(s)	絵面, 良男; 湯本, 勲; 大迫, 典久 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 39(2), 133-141
Issue Date	1988-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23996
Type	departmental bulletin paper
File Information	39(2)_P133-141.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大水産彙報
39(2), 133-141. 1988.

多量の Poly-β-hydroxybutyrate を蓄積する海洋細菌について

絵面良男*・湯本勲*
大迫典久*・木村喬久*

A Marine Bacterium Accumulating Large Amount of Poly-β-hydroxybutyrate

Yoshio EZURA*, Isao YUMOTO*, Norihisa OSEKO*
and Takahisa KIMURA*

Abstract

Sixteen bacterial strains, which formed large slimy colonies on the medium and showed flocculate growth in the broth containing mannitol, were isolated from a nursery tank used for the forced cultivation of konbu (*Laminaria japonica*). The isolates were identified as *Pseudomonas marina* on the basis of their morphological, cultural, physiological characteristics and DNA G+C mole percent. The cells of *P. marina* growing in the mannitol containing medium accumulated large amount of poly-β-hydroxybutyrate which was about 30% of the dry weight of the cells.

Among the samples of seawater, bottom sand and fronds of konbu collected at coastal region of Funka Bay, Hokkaido, *P. marina* was most abundant in decomposing frond of konbu and could be easily isolated.

緒　　言

著者らはここ数年来，北方冷水海域における有用資源である褐藻類の生育と微生物の関連性に注目し，種々の検討を進めてきた。その過程において 1986 年 10 月，北海道南茅部町のコンブ採苗場において，従来知られているマコンブ種苗糸赤変病害（絵面ら，1988b）とは異なり，赤色斑を伴わない種苗の芽落ち被害が発生した。この試料からマコンブに対して直接的な病原性はないが，固型培地上で粘性の強い大型集落を形成し，液体培地中で特異な細胞凝集塊を生じ，かつ多量の poly-β-hydroxybutyrate（以下 PHB と略す）を蓄積する海洋細菌を分離した。

PHB は多岐にわたる細菌種が細胞内に蓄積する炭素およびエネルギー貯蔵物質で β-ヒドロキシ酪酸の長鎖ポリエステルとされている（Law and Slepecky, 1960）。PHB を多量に蓄積する代表的な細菌として *Bacillus megaterium* が知られており，炭素源が豊富で窒素源の乏しい培養条件下で菌体乾重量の 40% 以上も蓄積するとされている（Williamson and Wilkinson, 1958）。また，PHB 蓄積の有無はグラム陰性菌の分類上の重要な性質で，特に *Pseudomonas* 属の分類で重要視されている（Palleroni, 1984）。海洋細菌の分類においても，海洋における優勢細菌相をなしている *Pseudomonas* 属と *Alteromonas* 属の鑑別 Key の一つとなっている（Baumann et al., 1972）。そ

* 北海道大学水産学部微生物学講座
(*Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

れにもかかわらず，これまでに多量の PHB を蓄積する海洋細菌についてはほとんど知られていない。

本報ではこの多量の PHB を蓄積するマコンブ培養水槽試料分離菌の分類と本菌の沿岸海域における検出を試みたのでその結果を報告する。

実 験 方 法

1. 試　　料

1986 年 10 月 21 日，北海道南茅部町 A 採苗場において種苗の芽落ちが発生したマコンブ種苗培養水槽から種苗糸および同培養水槽水試料を採取した。また，同年 10 月 24 日，11 月 18 日，12 月 16 日に図 1 に示す地点での次の試料を採取した。すなわち，尾札部定点（母藻用禁漁区）においては表面海水，底砂，天然コンブ葉体を採取し，尾札部川河口，川汲川河口，安浦沿岸，臼尻 A，B 地点沿岸の 5 地点では沿岸海水および流れ藻（コンブ）を採取した。

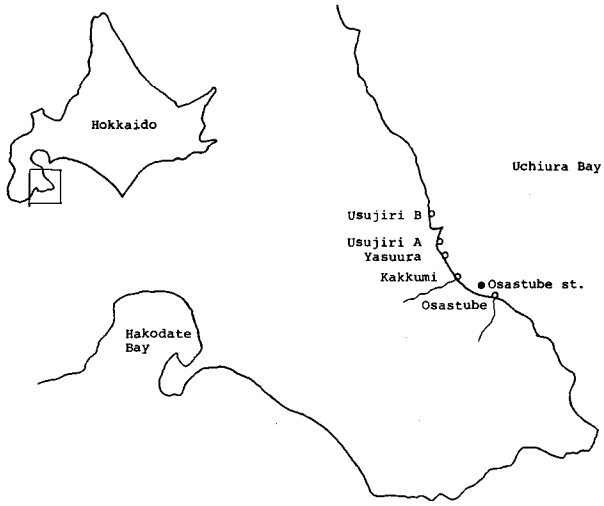

Fig. 1. Sampling station.

2. 菌の分離

種苗糸および芽落ちした芽胞体は滅菌海水で洗浄後，少量の滅菌海水を加えてストマッカー (Colworth 製) で 1 分間ホモジナイズしたものならびに種苗培養水槽水を 1 白金耳ずつコンブエキス寒天培地に塗抹接種し，20°C, 7 日間培養した。なお，コンブエキス培地は乾燥マコンブ細片 35 g に 1/3 希釈海水 500 ml を加え，0°C 一夜静置後，100°C, 30 分加熱して得られる抽出液を 1/3 希釈海水で 500 ml とし，NaCl 10 g, 寒天 7.5 g を加え，pH を修正せず (pH 約 5.6) 高圧滅菌して作製した。同培地上に生じた集落のうち粘性が強く，釣菌時にいわゆる糸を引く集落を選び釣菌し，海水寒天培地 (絵面ら，1980) で純粋分離を繰り返し計 16 菌株を分離した。

沿岸域採取試料のうち，海水はそのままを試料原液とし，底砂は秤量後 10 倍量の滅菌海水に懸濁したものを原液とし，コンブ葉体は細片を切り取り秤量，10 倍量の滅菌海水を加えストマッカーで 5 分間ホモジナイズしたものを原液とした。各試料原液を滅菌海水で 10 進希釈し，各希釈

液を 0.2 ml ずつ CAM 培地 (絵面ら, 1988a) および前述のコンブエキス寒天培地に表面塗抹し, 20°C 7 日間培養後, 生菌数を測定した。生菌数測定後のコンブエキス寒天培地上の集落より前述と同様にして計 138 菌株を分離した。

3. 分離菌株の性状検査

芽落ち種苗試料分離菌株 16 株についてグラム染色, 運動性, オキシダーゼ, カタラーゼ, アルギニン脱水素酵素, 硝酸塩還元, 高分子物質分解, 発育温度域などの性状は坂崎 (1967), Cowan (1972) などの方法により検査した。さらに糖の分解は MOF 培地 (Leifson, 1963), 塩類要求性は Hidaka and Sakai (1968) の培地を用い, 鞭毛染色は West et al. (1977), PHB 蓄積は Baumann et al. (1971) の方法により検査した。また, Marmur (1961) の方法により DNA を抽出・精製し, Marmur and Doty (1962) に従って DNA GC mole% を求めた。分離菌の同定は Cobet et al. (1970), Baumann et al. (1972), Palleroni (1984) の記載に従って行った。

なお, 沿岸採取試料分離菌株についてはグラム染色, 運動性, 鞭毛染色, グルコース分解 (MOF 培地), オキシダーゼ, 塩類要求性を上述の方法で調べ, 上記種苗試料分離菌株と比較した。

また A 採苗場より分与を受けたマコンブ健全種苗糸 (培養 5 週目) 5 cm を滅菌海水 200 ml 入りビーカーに入れ, これに芽落ち種苗試料分離菌代表株 M-5-*l* 株の培養菌液を 1 白金耳接種し,

Incubated in MYC medium on shaker at 25°C for 40 hr
↓
Centrifuged at 8,000 rpm for 20 min
↓
(Cells)
↓
Washed in DW
↓
Centrifuged at 8,000 rpm for 20 min
↓
(Cells)
↓
Suspended in DW
↓
Sonicated at 10 kc for 10 min
↓
Centrifuged at 8,000 rpm for 20 min
↓
(ppt)
↓
Suspended in DW
↓
Dialyzed for DW at 0°C for 12 hr
↓
Centrifuged at 8,000 rpm for min
↓
(ppt)
↓
Washed in aceton
↓
Centrifuged at 8,000 rpm for 20 min
↓
Washed in ethanol
↓
Centrifuged at 8,000 rpm for 20 min
↓
(ppt)
↓
Dried

Fig. 2. Procedure of extraction of PHB-like substance from *P. marina* M-5-*l*

15°C, 明期 12 時間で培養し，マコンブ芽胞体の変化の有無を 7 日間観察した。

4. 菌体の超薄切片作製ならびに電子顕微鏡観察

芽落ち種苗試料分離菌株代表株 M-5-*l* 株を MYC 培地 (マンニトール 5 g, Difco 酵母エキス 1 g, Difco カザミノ酸 2.5 g, 75% 人工海水 1,000 ml, pH 7.5) で 25°C 48 時間静置培養し，集菌後 Ryter-Kellenberger の固定法 (川田, 1982) により菌体寒天混合物の細片を作製し，0.5% 酢酸ウラン溶液で 4°C 2 時間染色した。次いでアルコール脱水後エポン樹脂に包埋し，常法によりガラスナイフで超薄切片を作製し，電子顕微鏡 (日立, H-300) にて観察した。

5. PHB の抽出・同定

分離菌代表株 M-5-*l* 株を MYC 培地に接種し 25°C 40 時間振盪培養し，得られた菌体から Law and Slepecky (1960) の方法を若干改変した図 2 に示す方法で PHB の抽出・精製を行った。抽出物について水，有機溶剤，酸，アルカリに対する溶解性を調べた。さらに Law and Slepecky (1980) の方法に従って試料を濃硫酸によって加水分解し，その分解物の紫外部吸収スペクトルから PHB の確認を行った。

また，M-5-*l* 株抽出物 (PHB) の細菌による分解性を Delafield et al. (1965) の方法に従って，抽出物を添加した重層寒天平板法で調べた。

結　　果

1. 芽落ち種苗試料分離菌株の性状と同定

芽落ち種苗試料分離菌 16 株はコンブエキス培地上で粘性で無色の大型集落を形成し，釣菌の際に糸状に伸び，培養日数 10 日以上では集落がゴムノリ状に拡散した。また，MYC 液体培地中では細胞集塊を形成して発育し，その細胞は染色性が不均一で細胞周辺部のみが染色されたが，MYC 培地よりマンニトールを除いた培地中で発育した細胞は集塊を形成せず，染色性も均一であった。分離菌 16 株の性状は表 1 に示すごとくすべて同一性状を示した。

本分離菌はグラム陰性短桿菌で単極毛を有し，オキシダーゼ陰性，カタラーゼ陽性の好気性菌で PHB を蓄積する。好気的にグルコース，ガラクトース，イノシトール，ラクトース，マルトース，マンニトール，マンノース，サッカロースを分解するが，ゼラチン，デンプン，ツィーン 80 を分解せず，硝酸塩を還元せず，アルギニン脱水素酵素陰性で，5～40°C で発育するが，食塩無添加培地で発育しない海洋細菌で DNA, GC mole % は 64.6 であった。

以上の本分離菌の性状は Cobet et al. (1970) が米国ウッズホール沿岸海水から分離した菌で，ニッケルを含む培地で異常形態を示し，グラム染色性不定であることから *Arthrobacter* 属の新種とした *A. marinus* の記載性状とグラム染色性を除き一致した (表 1)。その後，Baumann et al. (1972) は *A. marinus* がグラム陰性であり，*Arthrobacter* 属標準株と類縁性に乏しいことから *Pseudomonas* 属に移し，*P. marina* とすることを提案し，Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1 (Palleroni, 1984) においてもこの提案を採用している。以上の点を考慮して本分離菌を *P. marina* と同定した。

なお，本分離菌代表株 M-5-*l* 株のマコンブ種苗への接種実験で，マコンブ芽胞体に何らの異常も観察されなかった。

2. 分離菌株の PHB 蓄積

上記芽落ち種苗試料分離菌 16 株のコンブエキス培地発育菌体は PHB を蓄積した。その代表菌

Table 1. Characteristics of isolated strains from a cultured *Laminaria japonica* and *Arthrobacter marinus* (Cobet et al., 1970)

	A	B		A	B
Gram	−	v*1	Hydrolysis of		
Cell form	sr	sr*2	chitin	−	
Flocculent			gelatin	−	−
in broth	+		casein	−	
Motility	+	+	starch	−	−
Flagellum	mp	mp*3	alginate	+	
Oxidase	−	−	tween 20	+	
Catalase	+	+	tween 80	−	−
OF test	O	O*4	DNA	−	
Acid from			NO_3 reduction	−	−
arabinose	−	−	N_2 fixation	−	
fructose	+		Arginine		
galactose	+	+	dehydrolase	−	−
innositol	+	+	Growth in		
lactose	+	+	0% NaCl	−	−
maltose	+	+	1% NaCl	−	
mannitol	+	+	0.1% tannic acid	−	
mannose	+	+	Growth at		
raffinose	−		5°C	+	+
rhamnose	−	−	40°C	+	+
sorbitol	−	−	PHB accumulation	+	+
sucrose	+	+	DNA GC mole %	64.6	63.3
xylose	−	−			

A : isolated strains (16 strains), B : *Arthrobacter marinus*, *1 variable, *2 short rods, *3 mono polar, *4 oxidative.

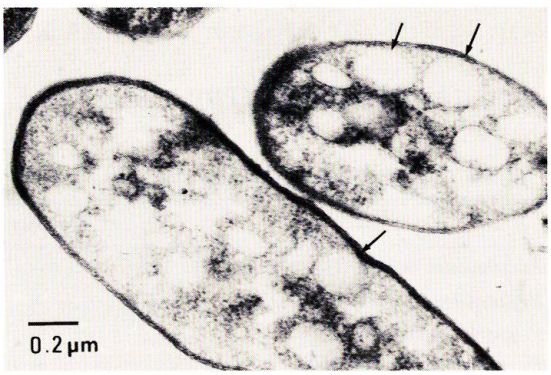

Fig. 3. Electrom micrograph showing low electron dense granules (PHB, arrows) in the cells of *P. marina* M-5-*l*.

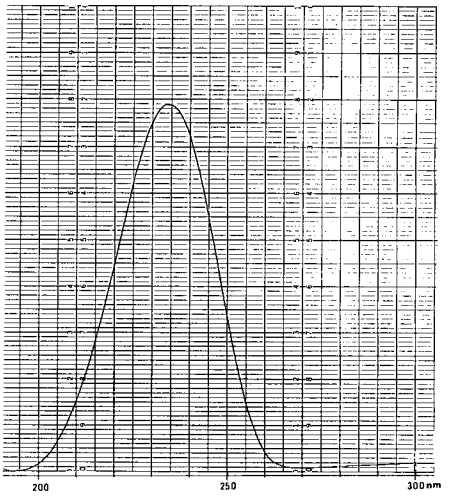

Fig. 4. Spectrum of PHB-like substance extracted from *P. marina* M-5-*l*, after hydrolysis by conc-H_2SO_4.

株 M-5-*l* 株の MYC 培地発育菌体の超薄切片電顕像を図 3 に示した。細胞内に膜構造に包まれた電子密度の低い構造物が観察された。

M-5-*l* 株を MYC 培地 1,000 ml に培養して得られた菌体 (乾重量 1.2 g) から図 2 に示す方法で抽出・精製された物質は白色の繊維状物質 (収量 0.35 g, 菌体乾重量当たり 29.2%) で，水，エタノール，メタノール，n-ブタノール，酢酸エチル，アセトン，エーテル，石油エーテル，ベンジンに不溶で，熱クロロホルムに難溶であった。また，1 N 硝酸および 4 N 塩酸中で 121°C 15 分の加熱で分解されず，濃硫酸中で 100°C 10 分の加熱で分解された。同分解物の紫外部吸収スペクトルは 234 nm に単一ピークを示し (図 4)，PHB の濃硫酸加水分解物クロトン酸の特徴を示した (Law and Slepecky, 1960)。

また，Delafield et al. (1965) の方法に従って M-5-*l* 株抽出物を加えた重層寒天培地上に M-5-*l* 株を含め 7 菌種の細菌を接種し，抽出物の分解の有無を調べた (表 2)。その結果マコンブ種苗糸赤変原因菌 *Alteromonas* sp. No. 8R 株のみが分解性を示し，本物質産生菌 M-5-*l* 株には分解性が認められなかった。

以上の結果を総合して M-5-*l* 株細胞内蓄積物質は PHB と同定された。

Table 2. PHB hydrolysis by some bacterial species

	Hydrolysis
Pseudomonas marina M-5-1 (isolated)	−
P. fluorescens NCMB 129	−
P. putida NCMB 406	−
P. saccharophila IAM 1504	−
Alteromonas sp. 1055-1	−
Alteromonas sp. No. 8R	+
Vibrio parahaemolyticus H05	−

Table 3. Distribution of *Pseudomonas marina* in the coastal area (1986)

Station	Sample	Oct. 24 Viable counts CAM medium	Oct. 24 Viable counts Konbu ext. m.	Oct. 24 *P. marina* /isolates	Nov.18 Viable counts CAM medium	Nov.18 Viable counts Konbu ext. m.	Nov.18 *P. marina*/ isolates	Dec.16 Viable counts CAM medium	Dec.16 Viable counts Konbu ext. m.	Dec.16 *P. marina* /isolates
Osatsube st.	seawater	—	—	—	3.1×10^3	1.5×10	0/ 5	1.4×10^3	0	0
Osatsube st.	mud	—	—	—	2.8×10^4	2.0×10	0/ 5	3.1×10^4	0	0
Osatsube	seawater	5.5×10^4	1.5×10	3/3	3.1×10^4	1.2×10^2	3/16	7.7×10^3	0	0
Kakkumi	〃	5.4×10^3	0	0	2.5×10^3	0	0	1.9×10^3	0	0
Yasuura	〃	—	0	0	—	6.0×10	0/ 7	—	0	0
Usujiri A	〃	—	5.0×10	4/4	—	8.5×10	0/ 9	—	0	0
Usujiri B	〃	—	0	0	—	5.5×10	0/11	—	0	0
Osatsube st.	konbu*1	—	—	—	9.5×10^4	0	0	0	0	0
〃	konbu*2	—	—	—	5.9×10^3	0	0	0	0	0
〃	konbu*3	—	—	—	3.7×10^5	7.0×10	1/11	1.4×10^6	0	0
Osatsube	konbu*4	4.4×10^7	7.0×10^2	2/3	1.3×10^5	2.6×10^2	1/14	4.6×10^4	5.0	1/ 1
Kakkumi	〃	1.1×10^4	0	0	4.1×10^7	1.1×10^3	0/10	—	1.4×10^2	1/10
Yasuura	〃	—	4.1×10^2	2/2	—	4.5×10	0/ 4	—	1.2×10^2	0/ 6
Usujiri A	〃	—	0	0	—	6.7×10^2	0/ 2	—	5.0×10	1/ 6
Usujiri B	〃	—	0	0	—	1.0×10^2	2/ 8	—	5.0	0/ 1

—: not determined, konbu: *Laminaria* sp., *1: meristems, *2: middle, *3: tips, *4: decomposing fronds.

3. *P. marina* の沿岸域における分布

本菌の同定は前述までの結果を参照して，グラム陰性短桿菌で単極毛を有し，オキシダーゼ陰性，好気的にグルコースを分解する海洋細菌でグラム染色像が不均一な赤色を呈するものとした。図1に示す6地点で3回にわたり採取した試料の生菌数，分離菌株数および本菌の検出結果を表3に示した。コンブエキス培地上で粘性集落を形成した分離菌138株中，上記の性状で *P. marina* と同定されたものは21菌株であった。それらの検出試料についてみると尾札部定点の表面海水，底砂からは本菌が検出されず，天然コンブ葉体の先枯れ部分から1株検出されたのみであった。一方，沿岸海水では流れ藻漂着の多い尾札部川河口水から6株，臼尻A地点海水から4株検出された。流れ藻（コンブ）では尾札部川河口採取試料すべてから検出され（4株），他の4地点採取の試料ではそれぞれ3回の試料採取のうち1回ずつ計6株検出された。なお各試料の生菌数と本菌の検出結果の間には相関性は認められなかった。以上の結果から，本菌は沿岸域特に多量の流れ藻の漂着する地点に多く分布する可能性が示唆された。

考　　察

芽落ちの発生したマコンブ種苗培養水槽から分離され，特異的な培養性状を示す海洋細菌は *P. marina* と同定された。本菌はマンニトールやアルギン酸を分解・利用する能力を有し（表1），沿岸域における分布調査においても枯死したコンブ葉体の漂着する地点で多く検出されることから（表3），本菌がコンブの生活史に深く関連した生態を有することが推察される。しかしながら，本菌のマコンブ芽胞体に対する病害作用は認められないことから，芽落ちの発生した種苗培養水槽から本菌が多数分離される原因は次のように考えられる。すなわち，他の原因によりマコンブ芽胞体が損傷を受けて脱落したことにより水槽中に本菌の利用可能なマンニット，アルギン酸等の炭素源が増加し，これらを利用して本菌が発育増殖したものと推察される。

本菌の存在と北海道南部各地で多発するマコンブ種苗糸赤変の原因菌 *Alteromonas* sp.（絵面ら，1988b）の生態上の関連性が注目される。赤変原因菌 *Alteromonas* sp. は他の細菌細胞を溶菌利用する特異的な性状を有する点ならびに *P. marina* の産生PHBを分解しうる点（表2）から，赤変原因菌のマコンブ種苗培養水槽内における増殖ならびに沿岸海域における生態に *P. marina* が深く関与している可能性が考えられる。この点に関しては今後より詳細な検討を要する課題と考える。

ところで，*P. marina* は炭素源およびエネルギー源として菌体内にPHBを蓄積すると考えられるにもかかわらず，培地に添加されたPHBの分解性を示さなかった（表2）。現在，*Pseudomonas* 属はPHB蓄積の有無で分類上大きく2つのグループに分けられ，さらにPHBの分解性がPHB蓄積グループの種同定Keyとして挙げられている（Palleroni 1984）。PHB蓄積グループ15種のうちPHB分解能は5種のみで知られており，他の菌種はPHB分解酵素を菌体外に産生しないものと考えられている。

また，PHB分解性が *Pseudomonas* 属の同定Keyとして重視されているにもかかわらず，PHB標品は市販されておらず研究者各自が *Bacillus megaterium* から調整して用いている。本菌が多量のPHBを蓄積することから，今後，この目的に利用可能と考えられる。さらに近年，PHBが微生物分解可能な可塑性天然ポリマー素材として注目されていることから（今堀・山川，1984），この面でも本菌の利用，ひいてはその培養基質としての褐藻類の高度利用も可能であると考えられる。

謝　　辞

本研究の遂行に当たり種々御協力を頂いた渡島東部地区水産技術普及指導所および南茅部町各採苗センターの各位に厚く感謝申し上げる。また本研究は農林水産省バイオテクノロジー先端技術シーズ培養研究によった。ここに記して謝意を表する。

文　　献

Baumann, P., Baumann, L. and Mandel, M. (1971). Taxonomy of marine bacteria: The genus *Beneckea*. *J. Bacteriol.* **107**, 268-294.

Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M. and Allen, R.D. (1972). Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J. Bacteriol.* **110**, 402-429.

Cobet, A.B., Wirsen, C.J. and Jones, G.E. (1970). The effect of nickel on a marine bacterium, *Arthrobacter marinus* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* **62**, 159-169.

Cowan, S.T. (1974). 医学細菌同定の手びき，坂崎利一訳，335 p. 近代出版，東京.

Delafield, F.P., Doudoroff, M., Palleroni, N.J., Lusty, C.J. and Contopoulos, R. (1965). Decomposition of poly-β-hydroxybutyrate by pseudomonads. *J. Bacteriol.* **90**, 1455-1466.

絵面良男・山本啓之・吉水　守・田島研一・木村喬久 (1980). 大槌湾サケマス海面養殖海域の微生物学的調査，大槌センター報告，6，51-62.

絵面良男・川端美樹・宮下富美江・木村喬久 (1988a). 促成マコンブ種苗培養水槽中の細菌群の変動について．日水誌，**55**，印刷中.

絵面良男・山本啓之・木村喬久 (1988b). 促成マコンブ種苗糸赤変原因菌の分離．同誌，**55**，印刷中.

Hidaka, T. and Sakai, M. (1968). Comparative observation of inorganic salt requirement of the marine and terrestrial bacteria. p. 125-149. in Kadota, H. and Taga, N. ed. Proceeding of U.S. Japan seminar on marine microbiology, *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ.* No. 12.

今堀和友・山川民夫 (1984). 生化学辞典．1532 p, 東京化学同人，東京.

川田十三男 (1972). 細菌への応用，p. 39-59, 天児和暘・小池聖淳編，微生物学における電子顕微鏡技術 (F). 130 p, 学会出版センター，東京.

Law, J.H. and Slepecky, R.A. (1960). Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* **82**, 33-36.

Laifson, E. (1963). Determination of carbohydrate metabolism of marine bacteria. *J. Bacteriol.* **85**, 1183-1184.

Marmur, J. (1961). A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218.

Marmur, J. and Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermol denaturation temperature Ibid. **5**, 109-118.

Palleroni, N.J. (1984). Genus I. *Pseudomonas*. p. 141-199, in Krieg, N.R. and Holt, J.G. ed. Bergey's manual of systematic bacteriology. vol. 1, 964 p. Williams and Wilkins, Baltimore.

坂崎利一 (1967). 培地学各論 (1). 232 p, 納谷書店，東京.

West, M., Burdash, N.M. and Freimuth, F. (1977). Simplified silver plating stain for flagella. *J. Clin. Microbiol.* **6**, 414-419.

Williamson, D.H. and Wilkinson, J.F. (1958). The isolation and estimation for the poly-β-hydroxybutyrate inclusion of *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* **19**, 198-209.