

生育パターンの異なる低温性 *Vibrio* 属細菌の生育に伴う菌体タンパク質の変動

森井 秀昭, 笠間憲太郎, 中川 栄治

Changes with Growth in Cellular Proteins of Psychrotrophic *Vibrio* spp.  
Having Different Growth Patterns

Hideaki MORII, Kentaro KASAMA, and Eiji NAKAGAWA

In order to study whether the psychrotrophic *Vibrio* isolates showing different growth curves are composed of different ecotype, cellular proteins of the non-halophilic and halophilic psychrotrophs during growth were determined by two-dimensional gel electrophoresis using isoelectric focusing in one dimension and sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the second dimension. Growth curves of the psychrotrophs showed an increased slope throughout growth (in Type 1 strains) or a decreased slope after the stationary phase of growth (in Type 2 strains). In cellular proteins of the non-halophiles, bands on both isoelectric focusing gels and SDS gels and spots on the two-dimensional gels were very clear for Type 1 strains and unclear (become foggy) for Type 2 strains, suggesting that the protein molecules have compact structure in Type 1 strains and deformable structure in Type 2 strains. In the halophiles, however, the protein bands and spots were clear for both Type 1 and 2 strains, suggesting that the molecules have compact structures for both Types of the halophiles. In the non-halophiles, the number and amounts of the protein spots increased in Type 1 strains during growth and decreased markedly in Type 2 strains during the death phase of growth. Moreover, the protein profiles obtained by the two-dimensional gel electrophoresis were very different between CBB and silver stainings and more proteins were observed in CBB staining in Type 1 strains and in silver staining in Type 2 strains of the non-halophiles. From these results, the difference of growth curves between Type 1 and 2 strains in the non-halophiles was considered to be based on the difference of physical and chemical structures for tertiary folding of protein molecules. In other words, it was suggested that the two Type strains of the non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* isolates are composed of different ecotype.

**Key Words:** 低温性 *Vibrio* 属細菌 psychrotrophic *Vibrio* spp.,  
非好塩性低温菌 nonhalophilic psychrotrophs, 好塩性低温菌 halophilic psychrotrophs,  
菌体タンパク質 cellular protein, 生育曲線 growth curve

## 緒 言

微生物はその種類により基本的生育温度（最低，最高および最適温度）を異にし，その違いにより微生物は慣習的に低温，中温および高温微生物の3つに区分され，さらにこれらは細分化される。これら区分された微生物は遺伝的に異なる形質をもち，これらの形質は微生物により進化的に獲得されたと考えられている。ところで，0℃下に貯蔵したサバから分離した低温性 *Vibrio* 属細菌<sup>1)</sup> と低温性 *Pseudomonas* 属細菌<sup>2)</sup> は菌株間で基本的生育温度を異にした。その上，これら低温細菌の最適温度での生育曲線は生育を通して増加傾向を示す菌群と定常期以降で減少傾向を示す菌群があり，これら異なる生育曲線を示す菌群間ではその基本的生育温度をも異にした<sup>1,2)</sup>。また，これら異なる生育曲線を示す菌群間では，培養中の各アデノシンリン酸 [アデノシン一リン酸 (AMP)，アデノシン二リン酸 (ADP) およびアデノシン三リン酸

(ATP)] 濃度のレベルおよび生育に伴う各アデノシンリン酸の消長が異なり，これらの違いは培養条件が異なっても同様な傾向を示した<sup>1,2)</sup>。つまり，異なる生育パターンをもつ菌群は遺伝的に異なる形質をもち，これらの形質は進化的に獲得されたと考えられた。このため，細胞を構成するタンパク質も，異なる生育パターンを示す菌群間で異なると判断された。そこで今回は，低温性 *Vibrio* 属細菌の生育パターンを異にする菌株の構成タンパク質を，等電点，SDSおよび等電点 - SDS 二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析により調べた。今回は陸性の *Vibrio* 属細菌に加え，海洋性の *Vibrio* 属細菌についても調べた。ところで，前報<sup>3)</sup> では生育パターンの異なる低温性 *Pseudomonas* 属細菌の生育に伴う菌体タンパク質の変動を述べた。ときに *Pseudomonas* 属細菌と *Vibrio* 属細菌ではアデノシンリン酸代謝に主要的に関与するグルコース代謝が根本的に異なる。アデノシンリン酸代謝の違いに基づき区分された菌群の研究を行うには，グル

コース代謝が根本的に異なる菌種を含めた研究をする必要がある。*Pseudomonas* 属細菌と *Vibrio* 属細菌はその代表的な主要菌種である。

#### 材料および方法

##### 供試菌株, 供試培地および培養方法

0 下に貯蔵したサバから分離した非好塩性および好塩性の低温性 *Vibrio* 属細菌<sup>3)</sup> のうち, 至適温度下での生育曲線が生育を通して増加傾向を示し (タイプ1型菌), 25 下に至適生育温度をもった非好塩性および好塩性の各2菌株, および同生育曲線が定常期以降に減少傾向を示し (タイプ2型菌), 25 下に至適生育温度をもった非好塩性および好塩性の各2菌株を用いた。培養にはNBG培地 [0.8% nutrient broth (BBL) と0.1%グルコースを50% 海水に溶かし, pH 7.4に調整] を用い, 静置培養した。

##### 供試菌の生育量の測定

至適生育温度下での測定は120時間まで, 10 下での測定は240時間まで経時的に600nmでの吸光度を測定した。

##### 電気泳動用試料としての菌体タンパク質の調製法

菌体タンパク質の調製はO'Farrellの二次元電気泳動における菌体タンパク質の試料調製法<sup>4)</sup> に準じて行った。まず, 500mL容三角フラスコにNBC培地300mLを入れ, 至適温度下で静置培養し, 対数期中期, 定常期および死滅期中期の培養液を4 , 9000回転/分で20分間遠心分離し, 菌体を集めた。この菌体に超音波用試料溶解液 [10mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に5 mM塩化マグネシウムとリボヌクレアーゼ (RNアーゼ) 50  $\mu$ g/mLを添加] の2 mLを加え懸濁後, 超音波破壊した。この破壊溶液の一定量 (1.5~2.0mL) を取り, デオキシリボヌクレアーゼ (DNアーゼ) 濃度が50  $\mu$ g/mLとなるようにDNアーゼ 保存液 [10mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に1 mM塩化マグネシウムとRNアーゼ 1 mg/mLを添加] を加え, 5分間以上氷中に放置した。この一定量 (600  $\mu$ L) を取り, 尿素を終濃度9 Mとなるように加え, さらにこの溶液と等量の試料溶解液を加え, 遠心分離し, その上清を電気泳動用試料とした。

##### 各試料タンパク質濃度の測定法

本試料には界面活性剤などの夾雑物が多く含まれているため, その影響が少ない比濁法<sup>5)</sup> によりタンパク質濃度を測定した。泳動用試料の一定量 (50~100  $\mu$ L) に蒸留水を加え1000  $\mu$ Lとし, これを濁度測定用試料とした。これにドデシル硫酸ナトリウム (SDS) およびトリクロル酢酸 (TCA) の終濃度がそれぞれ5%および15%となるように20%SDS溶液および60%TCA溶液を加え混和し, 30分後に600nmで吸光度を測定した。なお標準曲線には牛血清アルブミンを用い, これをもとに試料の濃度を求めた。泳動は全て一定量のタンパク質で行った。

##### 等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析法

等電点ポリアクリルアミド電気泳動はO'Farrellの二次元電気泳動法における等電点電気泳動法<sup>4)</sup> に準じて行った。試料は陰極側 (塩基性側) より添加し, 5 x 100mmのカラムを用い定電圧 (400V) で12時間泳動後, さらに800Vで1時間の泳動を行い, クーマシー・プリリアント・ブルー (CBB)-G 250<sup>6)</sup> により検出を行った。ゲル中に形成されるpH勾配はゲルを1 cm間隔に切断し, その各切片を試験管に入れ, 脱気後に蒸留水を加え2時間放置後, 水層のpHを測定することで求めた<sup>5)</sup>。

##### SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析法

SDSポリアクリルアミド電気泳動はLaemmliの方法<sup>7)</sup> に準じて行った。ゲル濃度7.5~15%の密度勾配平板ゲル160 x 160 x 1 mmを作成し, 定電流 (25mA) で3.5時間泳動を行い, CBB-G 250により検出を行った。なお, 試料と同時に分子量マーカーの泳動も行った。分子量マーカーはプロメガ社のものを用いた。

##### 二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析法

二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動はO'Farrellの二次元電気泳動法<sup>4)</sup> に準じて行った。一次元は1 x 130mmのカラムで等電点電気泳動, 二次元は160 x 160 x 1 mmの平板でSDS電気泳動した。泳動条件, タンパク質スポットの検出および分子質量の測定は前記同様とした。検出されたスポットの量を数値化するため, 泳動像をコンピューターに取り込み, 画像解析ソフト (アトー株式会社) を用い, その面積 (銀染色でのスポット) または体積 (CBB染色でのスポット) の相対値 (最も低いスポットの面積または体積を1とする) を求めた。

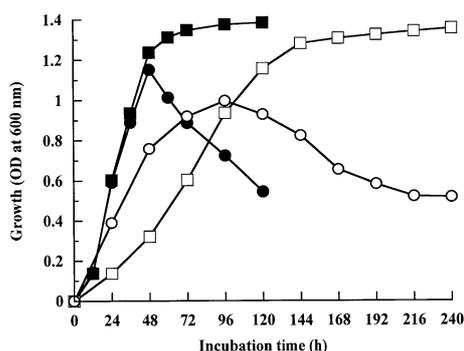
##### 銀染色法

James H. Morrisseyの方法<sup>8)</sup> に準じた。

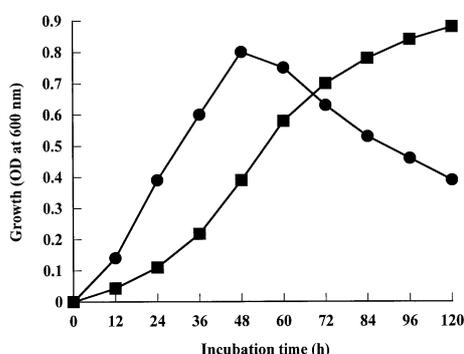
## 結 果

### 1. 発育量の経時的变化

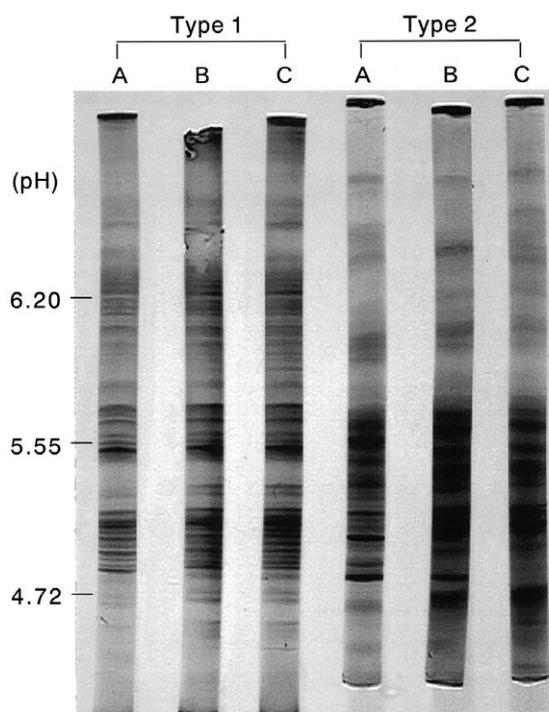
本研究に用いた非好塩性 *Vibrio* の至適温度培養および10 培養での生育曲線をFig. 1に, また好塩性 *Vibrio* の至適温度培養での生育曲線をFig. 2に示す。至適温度下で培養した非好塩性および好塩性 *Vibrio* とも生育を通して増加傾向を示す菌株 (タイプ1型菌) と定常期以降で減少傾向を示す菌株 (タイプ2型菌) が認められ, 特に非好塩性 *Vibrio* では10 下で培養しても至適温度培養と同様の傾向を示した。なお, 異なる生育パターンを示した非好塩性および好塩性 *Vibrio* の各2菌株について実験を行ったが, これら2菌株は同じ生育パターンを示したため, 各1菌株の結果を掲載した。



**Fig. 1** Growth curves of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V926 (Type 1 strain) grown at an optimum temperature (25 °C) and 10 °C, and *Vibrio* strain V1605 (Type 2 strain) grown at an optimum temperature (25 °C) and at 10 °C.



**Fig. 2** Growth curves of halophilic psychrotrophic *Vibrio* strains V1806 (Type 1, ) and V114 (Type 2, ) grown at an optimum temperature (25 °C).



**Fig. 3** Isoelectric focusing gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strains V926 (Type 1 strain) and V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (25 °C).

2. 非好塩性 *Vibrio*における生育に伴う菌体タンパク質の消長

1) 至適温度培養における生育に伴う菌体タンパク質の消長

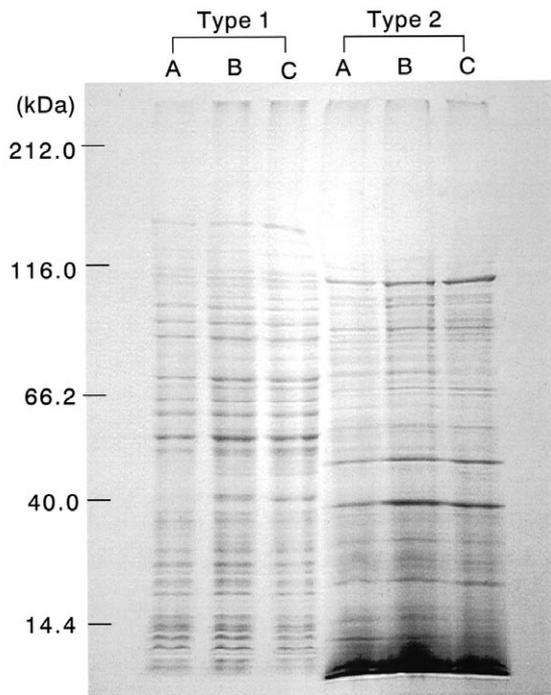
(1) 菌体タンパク質の等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動

至適温度培養での対数期, 定常期および死滅期における非好塩性 *Vibrio* のタイプ1型菌および2型菌 (以降1型菌および2型菌という) の菌体タンパク質の等電点電気泳動図を Fig. 3 に示す。なお, 1型菌および2型菌とも各2菌株について実験を行ったが, これら2菌株とも類似した結果を示したため, 各1菌株の結果を掲載した。以下の非好塩性および好塩性 *Vibrio* について得られたすべての電気泳動の結果についても同様とする。1型菌ではいずれの培養期の細胞とも中性側から酸性側まで各バンドが平均的に分布し, しかもバンドは鮮明であった。バンド数は対数期に比べ定常期・死滅期で多く, またバンドの濃度も対数期より定常期・死滅期で幾分か高かった。2型菌ではいずれの培養期の細胞ともpH 5.75以上のより中性側ではバンド数が極めて少なく, またバンドは不鮮明であった。pH 5.75以下では多くのバンドを認めたが, 定常期および死滅期と培養年齢が増すにつれてバンド数は減少し, またより不鮮明となった。

(2) 菌体タンパク質のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動  
至適温度培養での対数期, 定常期および死滅期における非好塩性 *Vibrio* の1型菌および2型菌の菌体タンパク質のSDS電気泳動図をFig. 4 に示す。1型菌ではいずれの培養期の細胞とも高分子側から低分子側まで鮮明なバンドが平均的に分布し, 培養年齢の違いで著しい差異を認めなかった。しかし, バンドの濃度は対数期に比べ, 定常期・死滅期で幾分か高かった。2型菌では116.0kDa以上のバンド数が少なく, また40kDa以下のバンドではその濃度が高く, この傾向は特に14.4kDa以下のバンドで顕著であった。また, 2型菌のバンドは不鮮明で, この傾向は低分子となるほど顕著であった。

(3) 1型菌の菌体タンパク質の二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動

至適温度培養での対数期, 定常期および死滅期における非好塩性 *Vibrio* の1型菌の菌体タンパク質のCBB染色および銀染色による二次元電気泳動図を各々Fig. 5 および6 に示す。CBB染色ではスポットは鮮明で, 特别是对数期から定常期にかけてスポットの濃度が高くなった。またスポットは主にpH 5.00~6.00, 分子量14.4~96.0kDaの範囲に平均的に分布した。銀染色ではスポットは鮮明で, 培養年齢が増すにつれてスポット数が増加し, またそれはpH 4.60~6.30, 分子量14.0~80.0kDaの範囲に平均的に分布した。また, CBB染色で認

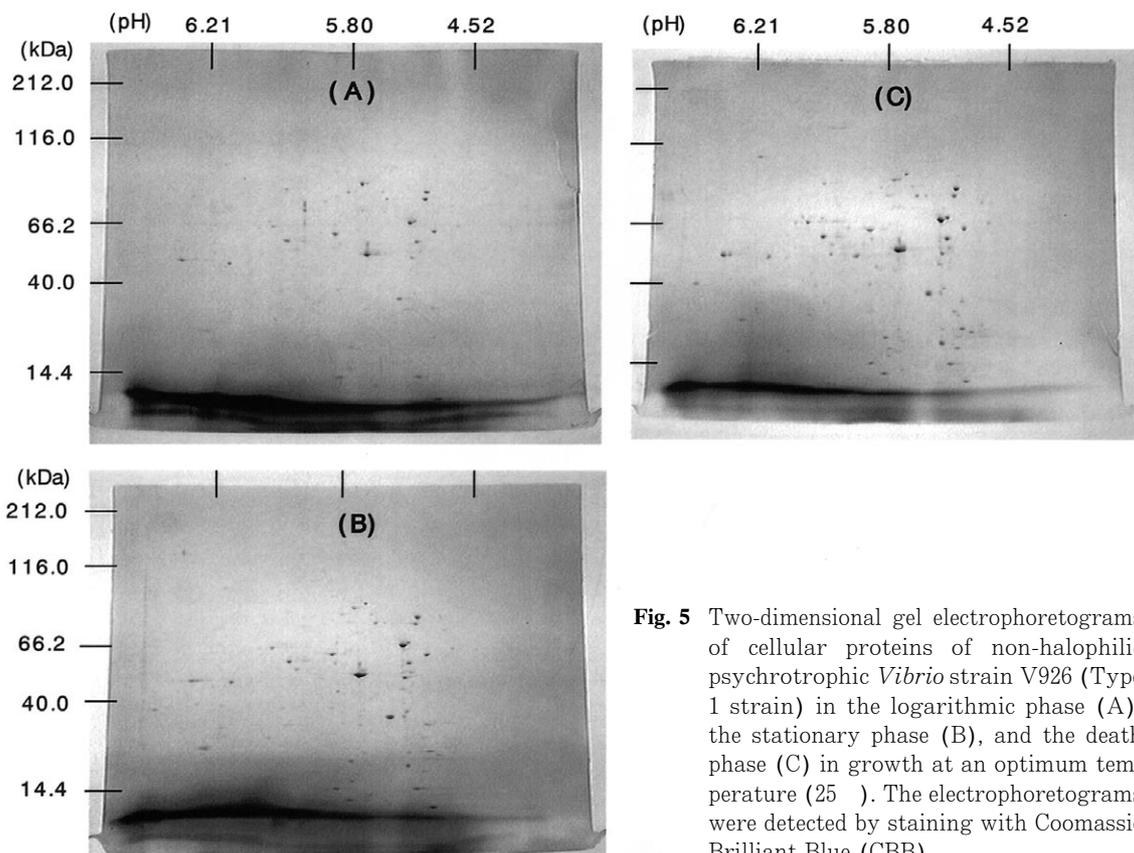


**Fig. 4** Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strains V926 (Type 1 strain) and V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (25 °C).

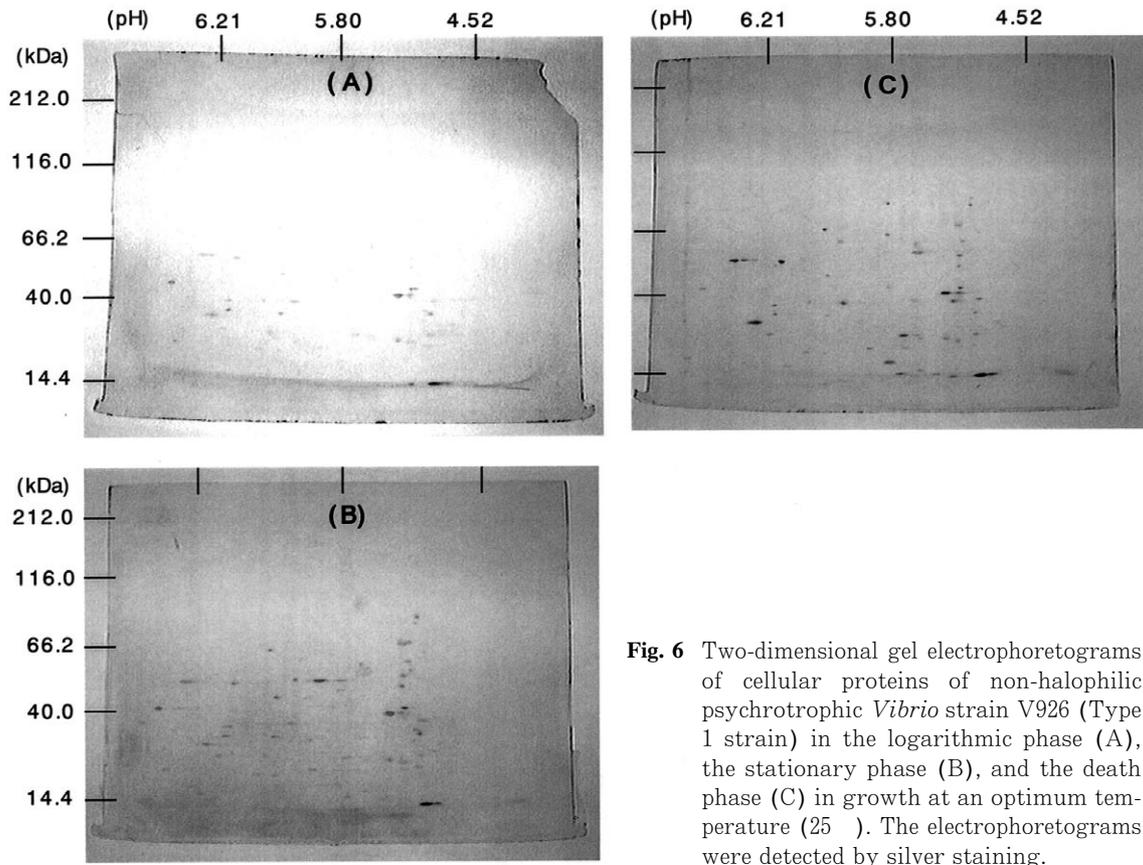
められるが銀染色では認められないスポット (pH 5.00 ~ 6.00, 分子量60.0 ~ 96.0kDaで顕著), 逆にCBB染色では確認できないが銀染色では確認できるスポット (pH 6.10 ~ 6.30, 分子量32.0 ~ 48.0kDaで顕著), さらに両染色でスポットが認められるがスポットの濃度が異なるなど, 両染色で検出されるスポットの種類およびその濃度が異なった。

#### (4) 2型菌の菌体タンパク質の二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動

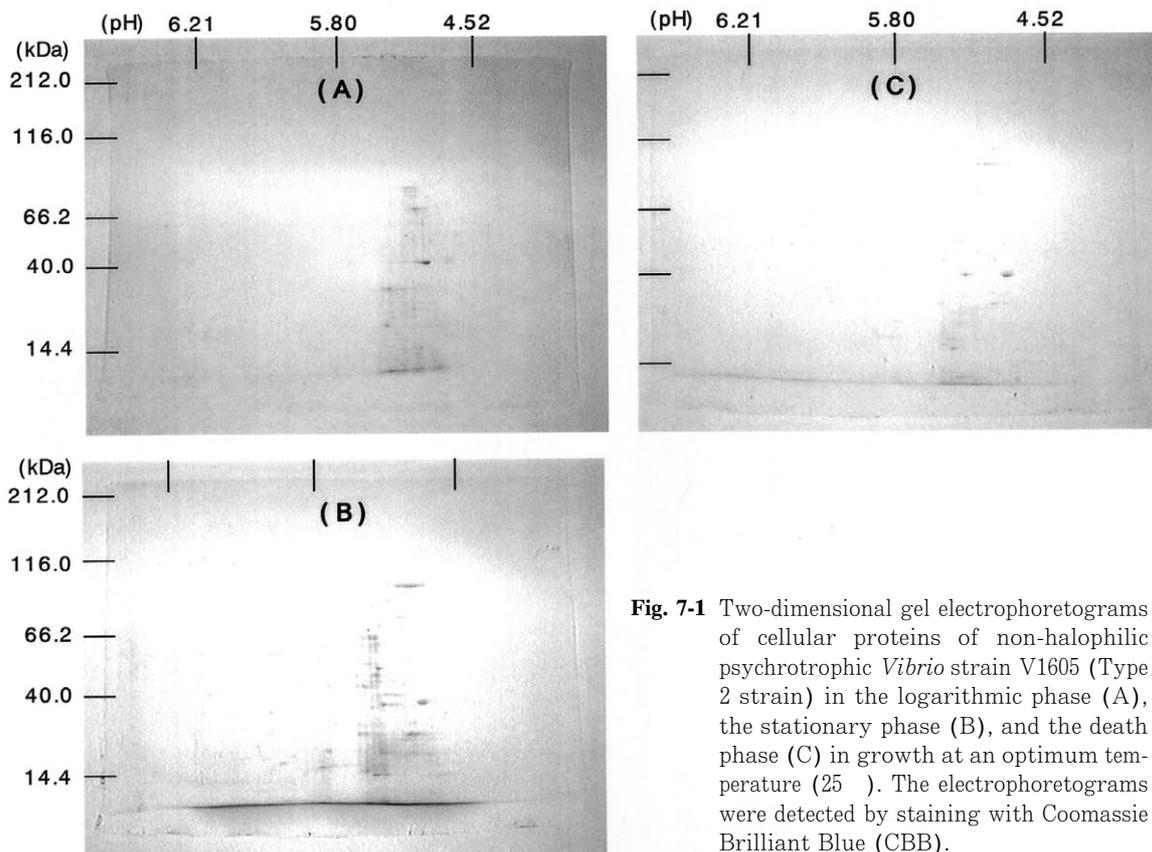
至適温度培養での対数期, 定常期および死滅期における非好塩性 *Vibrio* の2型菌の菌体タンパク質のCBB染色および銀染色による二次元電気泳動図を各々Fig. 7 - 1および8 - 1に, またそれらのコンピューター解析の結果を各々Fig. 7 - 2および8 - 2示す。CBB染色ではスポット数は1型菌に比べて極めて少なく, 対数期から定常期にかけて増加したが死滅期で減少し (特にFig. 7 - 2参照), またスポットは不鮮明であった。またスポットはpH 4.60 ~ 5.45, 分子量14.4 ~ 80.0kDaのごく限られた範囲にしか認められなかった。銀染色でもスポットは不鮮明で, スポット数は各培養期の細胞ともCBB染色よりも多数認められ, またそれは対数期から定常期にかけて増加し死滅期では減少した (特にFig. 8 - 2参照)。またスポットはpH 4.60 ~ 6.00, 分子量14.0 ~ 60.0の範囲に確認された。1型菌の場合と同様に, CBB染色と銀染色で検出されるスポットの種類および同じスポットでも両方でその濃度が異なった。



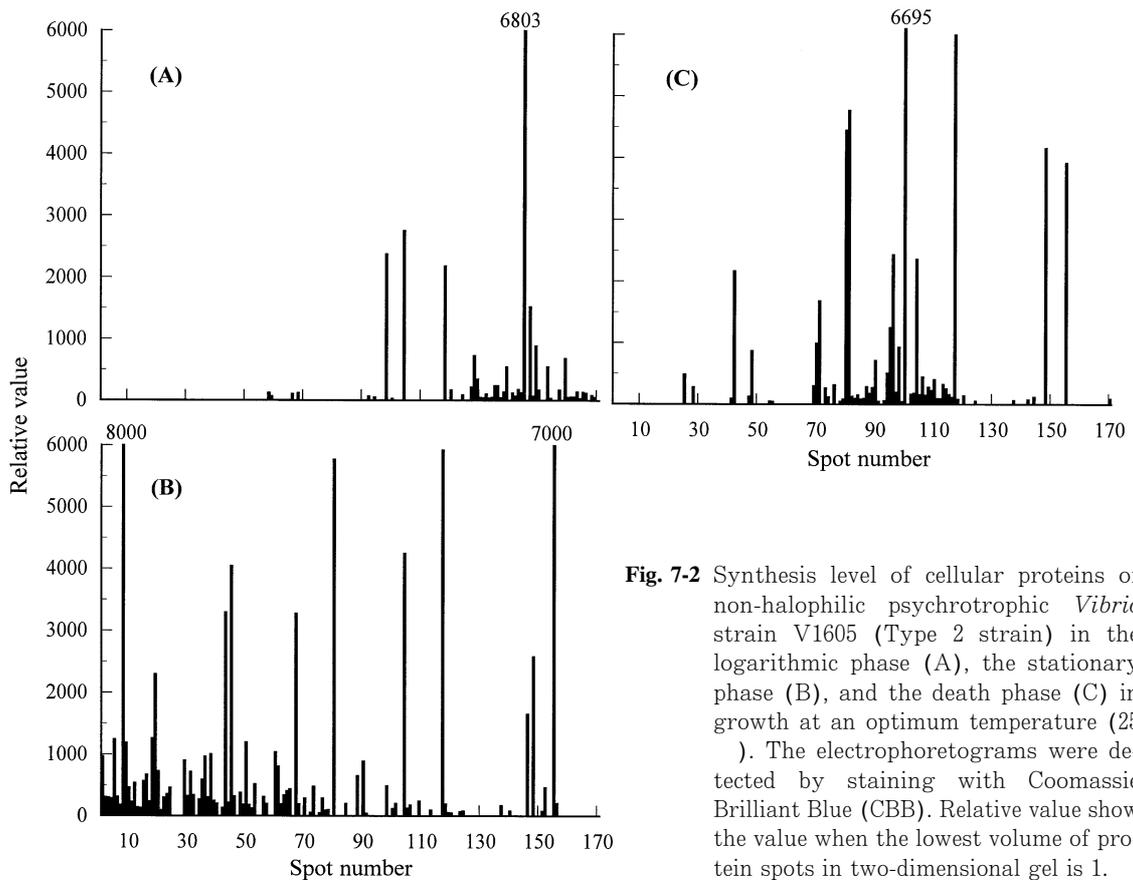
**Fig. 5** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V926 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (25 °C). The electrophoretograms were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB).



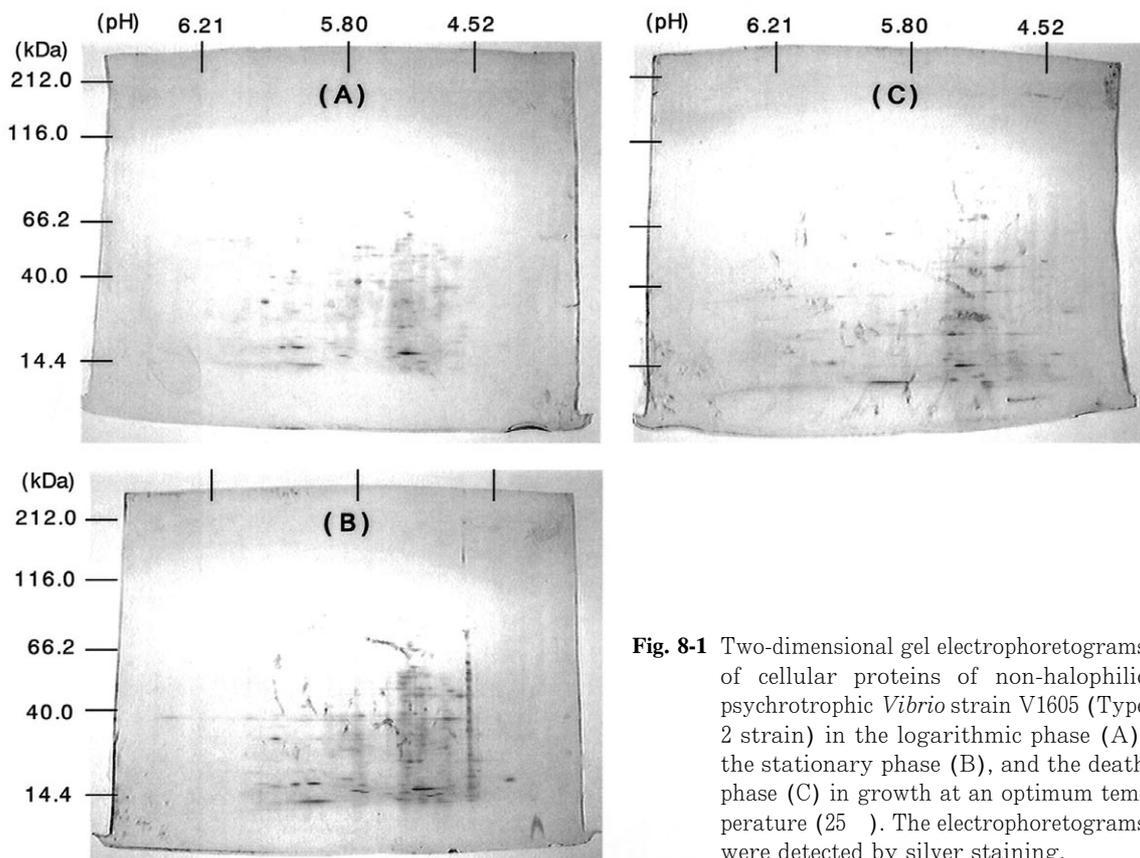
**Fig. 6** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V926 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (25 °C). The electrophoretograms were detected by silver staining.



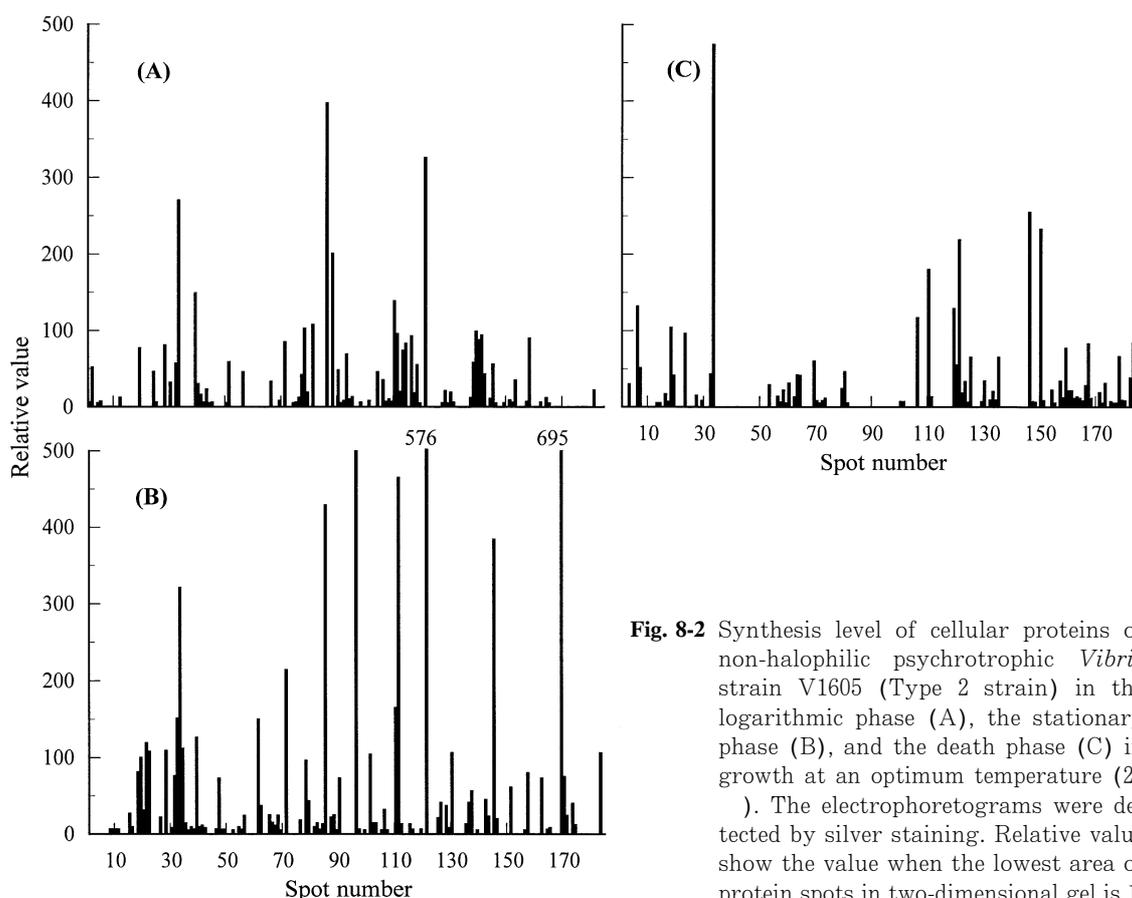
**Fig. 7-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (25 °C). The electrophoretograms were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB).



**Fig. 7-2** Synthesis level of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (25 ). The electrophoretograms were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB). Relative value show the value when the lowest volume of protein spots in two-dimensional gel is 1.



**Fig. 8-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (25 ). The electrophoretograms were detected by silver staining.



**Fig. 8-2** Synthesis level of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (25 °C). The electrophoretograms were detected by silver staining. Relative value show the value when the lowest area of protein spots in two-dimensional gel is 1.

## 2) 10 培養における生育に伴う菌体タンパク質の消長

### (1) 菌体タンパク質の等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10 培養での対数期、定常期および死滅期における非好塩性 *Vibrio* の 1 型菌および 2 型菌の菌体タンパク質の等電点電気泳動図を Fig. 9 に示す。1 型菌では鮮明なバンドが中性から酸性側まで広範囲に分布し、特に pH 5.00, 5.65 および 6.20 付近のバンドの濃度は高かった。また、培養齢に伴うバンドの構成の違いもほとんど認められなかったが、培養齢が増すにつれて幾分バンドの濃度が高くなった。これらの結果は、至適温度培養での結果とほぼ同様であった。2 型菌では中性側から酸性側までバンドが認められ、特に pH 5.00 付近のバンドの濃度は高く、またバンドは不鮮明で、これらの傾向は対数期・定常期に比べ死滅期で顕著であった。なお至適温度培養の結果と比べると、pH 5.45 以上の領域により多くのバンドが検出された。

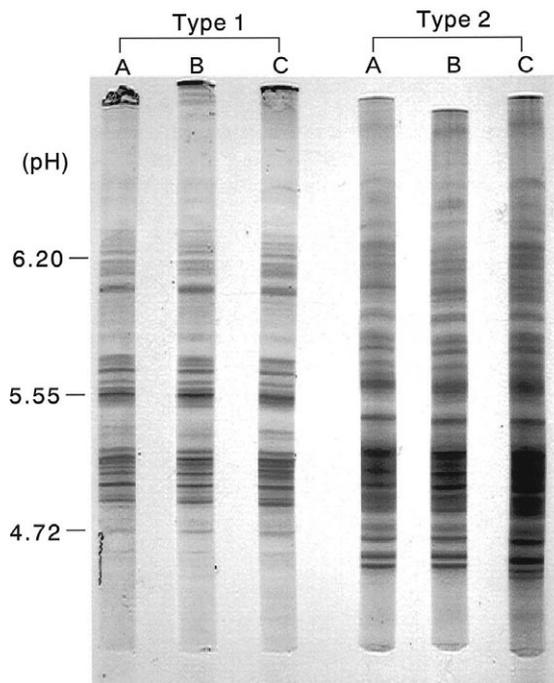
### (2) 菌体タンパク質の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10 培養での対数期、定常期および死滅期における非好塩性 *Vibrio* の 1 型菌および 2 型菌の菌体タンパク質の SDS 電気泳動図を Fig. 10 に示す。1 型菌では鮮明なバンドが低分子域から高分子域まで広範囲に検出され、また培養齢の違いでバンドの構成およびその濃度にほとんど違いを認めなかった。また、10 培養でのスポットの構成は至適温度培養でのそれ

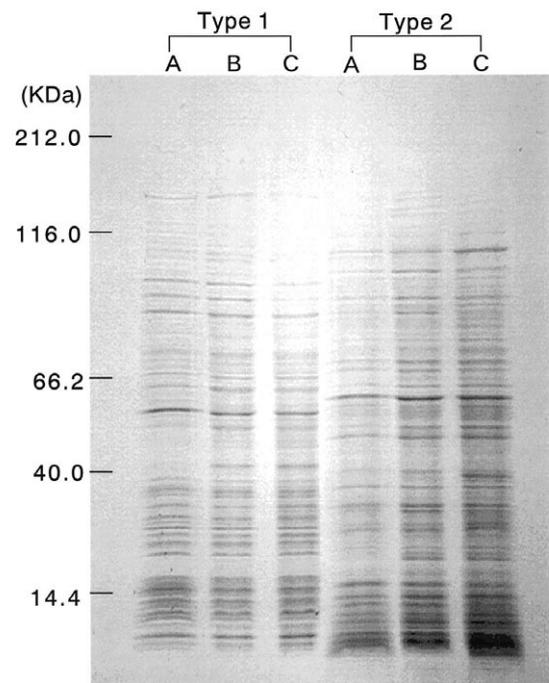
とよく類似した。2 型菌では、いずれの培養齢の細胞とも、幾分不鮮明なバンドが低分子域から高分子域まで分布した。またバンドの構成は培養齢による違いをほとんど認めなかったが、その濃度は培養齢が増すにつれて濃くなり、この傾向は低分子側ほど顕著であった。至適温度培養での結果と比べると、50kDa 以下のバンドが極めて多かった。

### (3) 1 型菌の菌体タンパク質の二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動

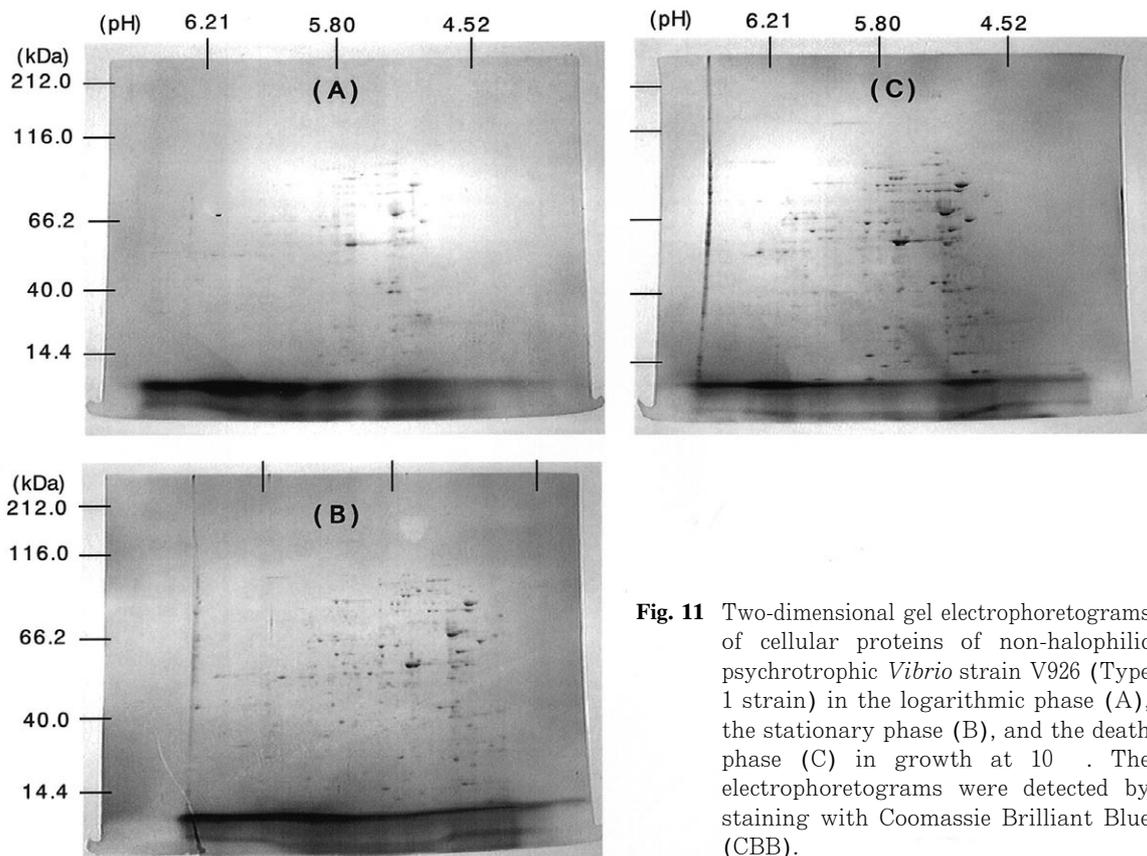
10 培養での対数期、定常期および死滅期における非好塩性 *Vibrio* の 1 型菌の菌体タンパク質の CBB 染色および銀染色による二次元電気泳動図を各々 Fig. 11 および 12 に示す。CBB 染色では培養齢が増すにつれてスポットの数および濃度が増した。スポットは主に pH 4.60 ~ 6.00、分子量 14.0 ~ 100.0kDa の範囲に分布した。なお、10 培養と至適温度培養ではスポットはほぼ同じ範囲に分布したが、スポット数および同一スポットではその濃度が 10 培養で著しく増加した。銀染色では培養齢が増すにつれてスポット数が増加し、またそれは主に pH 4.80 ~ 6.00、分子量 14.4 ~ 90.0kDa の範囲に分布した。CBB 染色に比べ銀染色ではスポット数が極めて少なく、またスポットの分布およびその種類、また同一のスポットでもその濃度が両方で極端に異なった。10 培養でのスポットの分布と至適温度培養でのその分布とは似た傾向を示したが、10 培養ではその数が減少していた。



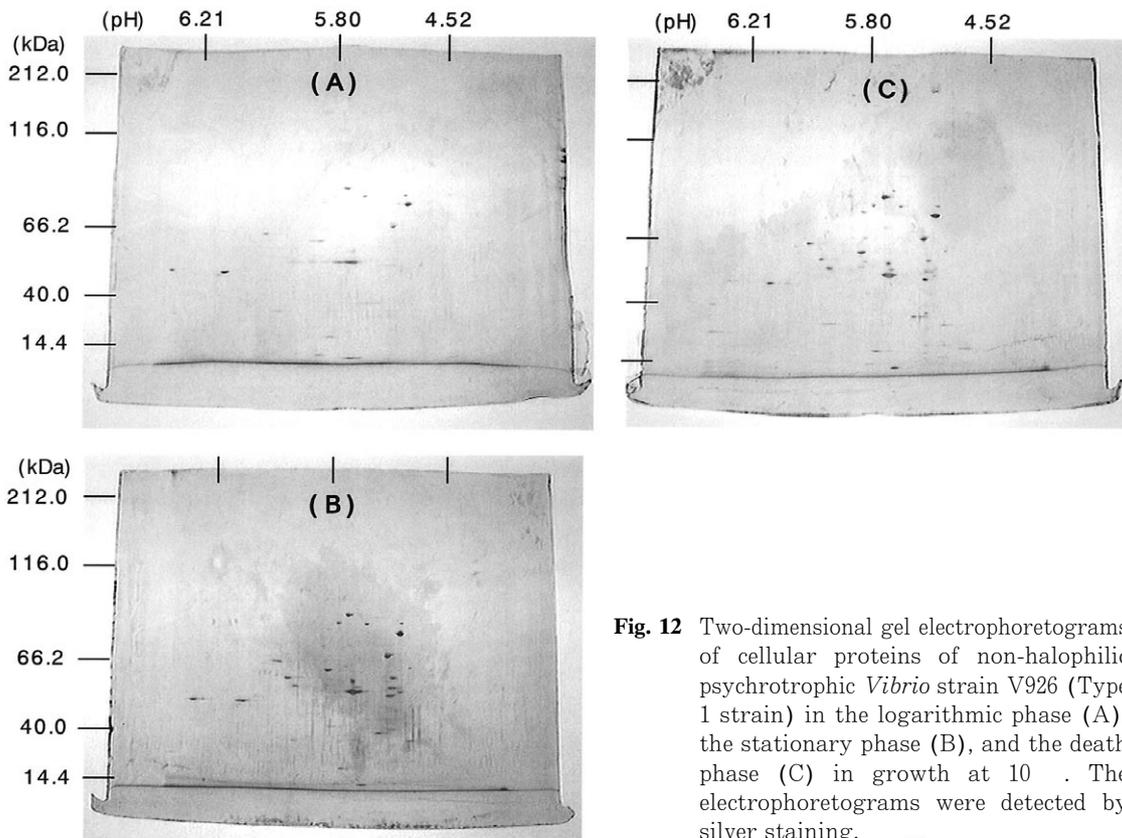
**Fig. 9** Isoelectric focusing gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strains V926 (Type 1 strain) and V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10°C.



**Fig. 10** Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strains V926 (Type 1 strain) and V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10°C.



**Fig. 11** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V926 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10°C. The electrophoretograms were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB).



**Fig. 12** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V926 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10°C. The electrophoretograms were detected by silver staining.

#### (4) 2型菌の菌体タンパク質の二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10 培養での対数期, 定常期および死滅期における非好塩性 *Vibrio* の2型菌の菌体タンパク質のCBB染色および銀染色による二次元電気泳動図を各々Fig.13 - 1および14 - 1, またそれらのコンピューター解析の結果を各々 Fig.13 - 2および14 - 2に示す。CBB染色ではスポットはpH 4.60~5.50, 分子量14.0~100.0kDaの範囲に限られ, それは対数期から定常期にかけて増加し死滅期で急減し(特にFig.13 - 2参照), またスポットは極めて不鮮明であった。すなわち至適温度培養での結果とほぼ同様であった。銀染色でもスポットは鮮明さを欠き, スポット数は培養齢が増すにつれて増加し(特にFig.14 - 2参照), またそれはCBB染色での数に比べて極めて多かった。またCBB染色の結果とは, スポットの分布およびその種類, また同一のスポットではその濃度が両者で著しく異なった。至適温度培養での銀染色での結果と比べると, スポットの分布の傾向は類似したが, スポット数が10 培養で著しく増加した。

### 3. 好塩性 *Vibrio*における生育に伴う菌体タンパク質の消長

#### 1) 菌体タンパク質の等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動

至適温度培養での対数期, 定常期および死滅期における好塩性 *Vibrio* の1型菌および2型菌の菌体タンパク質の等電点電気泳動図をFig.15に示す。1型菌および2型菌とも, いずれの培養齢の細胞でも中性側から酸性側まで鮮明なバンド

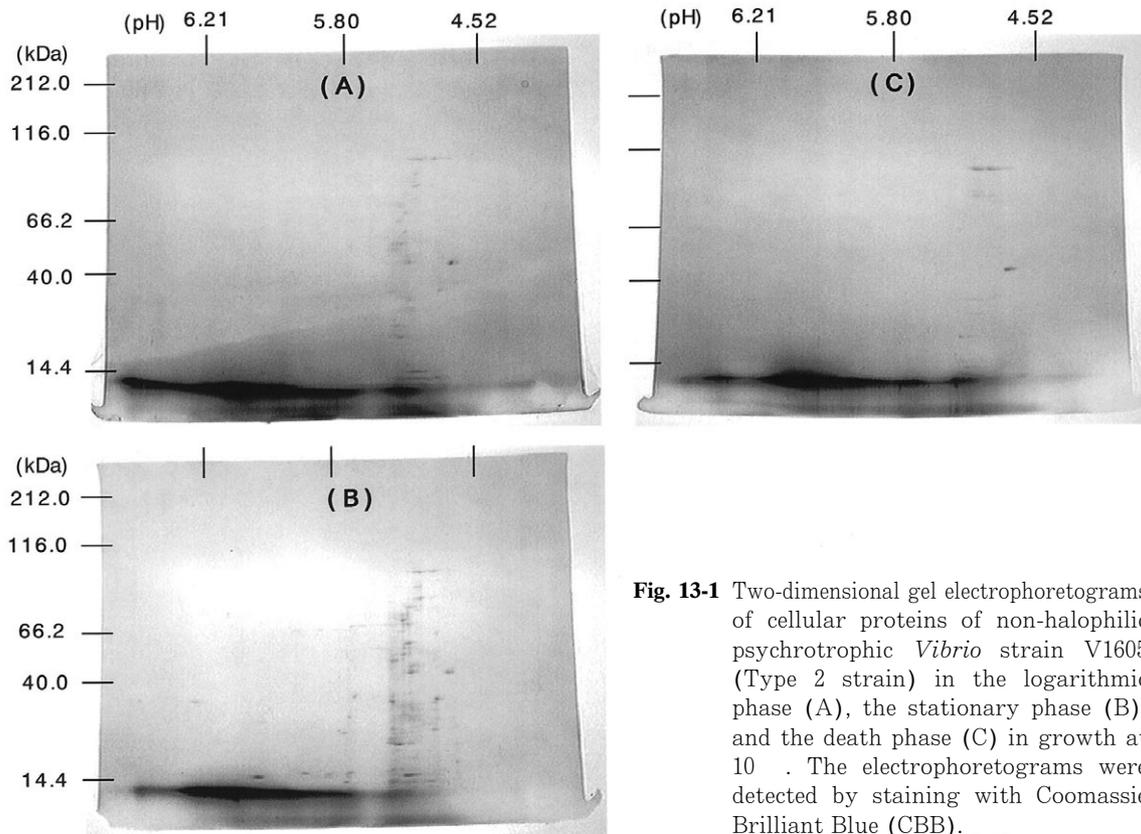
が平均的に分布した。また, 1型菌では培養齢が増すにつれて若干バンドの高濃度化を認めた。

#### 2) 菌体タンパク質のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

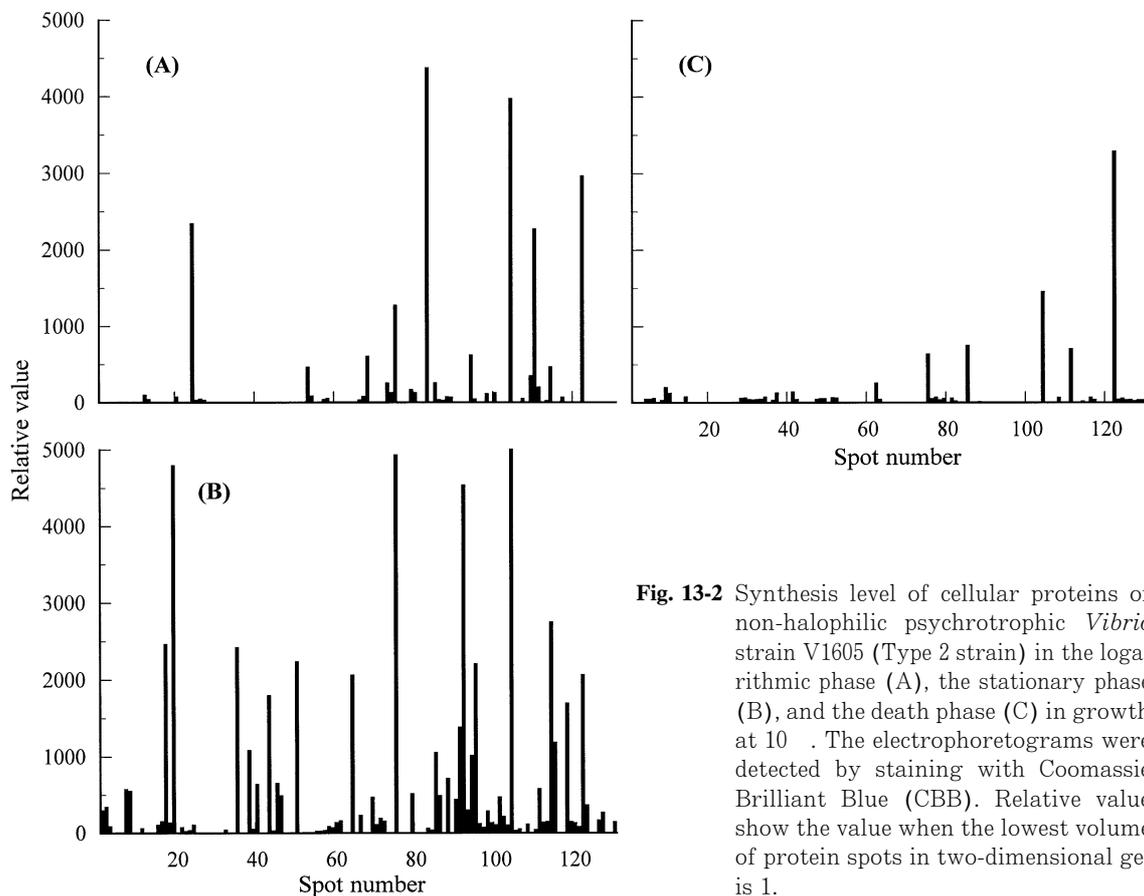
至適温度培養での対数期, 定常期および死滅期における好塩性 *Vibrio* の1型菌および2型菌の菌体タンパク質のSDS電気泳動図をFig.16に示す。1型菌および2型菌とも鮮明なバンドが高分子側から低分子側まで平均的に分布し, また培養齢によるバンドの構成の違いもほとんど認めなかった。

#### 3) 1型菌および2型菌の菌体タンパク質の二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動

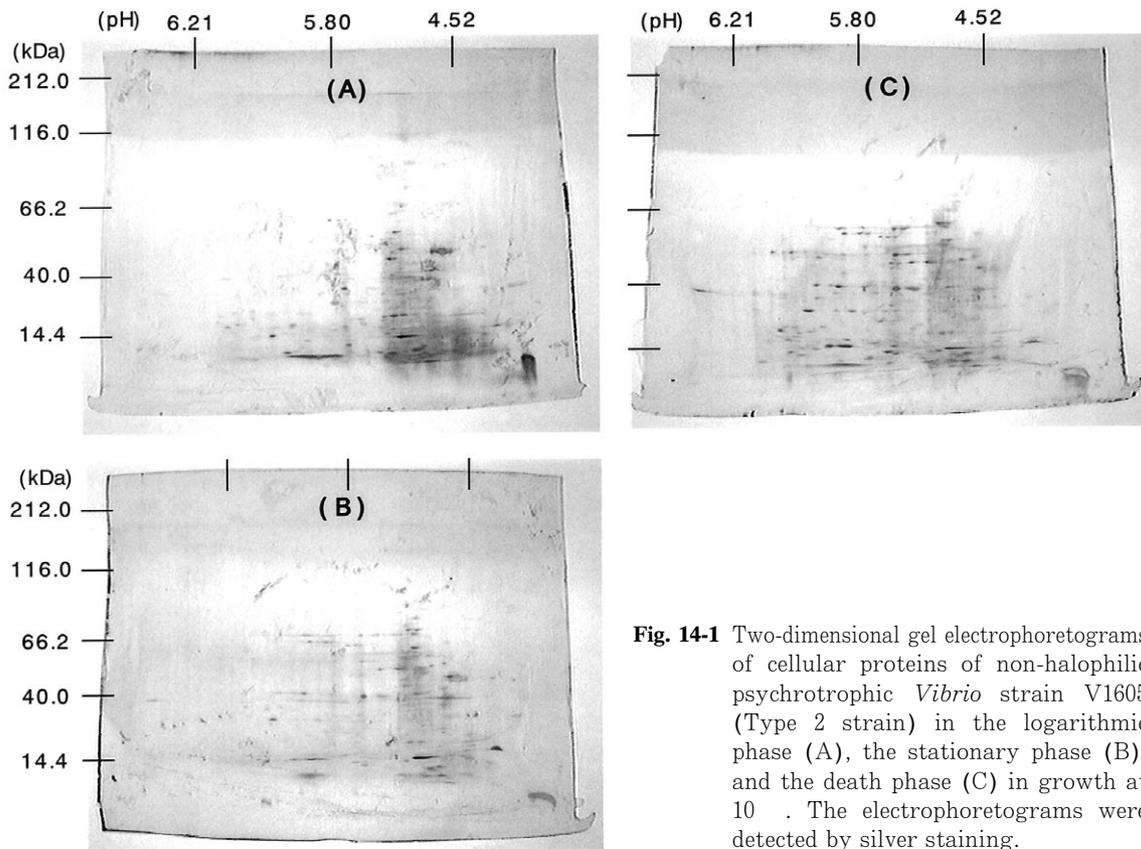
好塩性 *Vibrio* の1型菌および2型菌の, 至適温度培養での対数期, 定常期および死滅期における菌体タンパク質のCBB染色および銀染色による二次元電気泳動を行ったが, 泳動結果は好塩性 *Vibrio* の1型菌および2型菌とも, 非好塩性 *Vibrio* の1型菌の至適温度培養あるいは10 培養での結果と類似し, したがって泳動図の掲載を省略する。なおスポットの概要については, 好塩性 *Vibrio* の1型菌および2型菌のCBB染色および銀染色による二次元電気泳動の結果とも, スポットは鮮明で, スポット数およびその濃度は培養齢が増すにつれて増加した。しかしながら, スポットの構成は供試菌株で異なった。



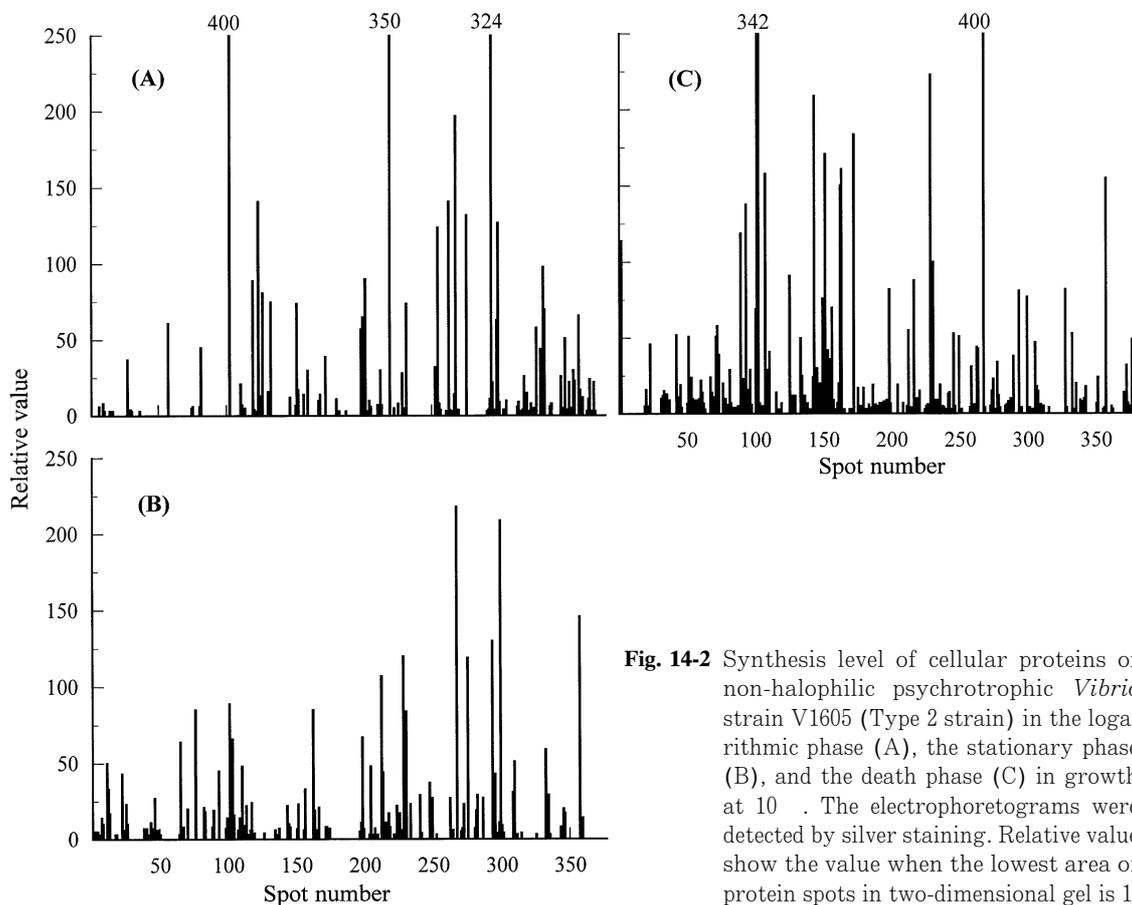
**Fig. 13-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10°C. The electrophoretograms were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB).



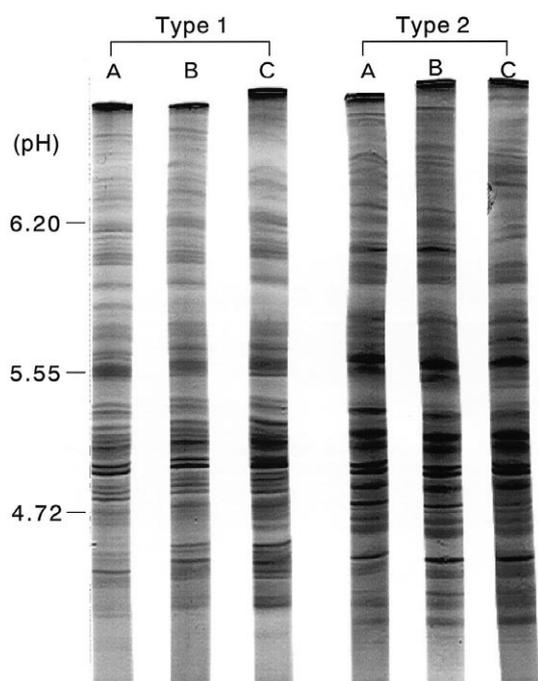
**Fig. 13-2** Synthesis level of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10°C. The electrophoretograms were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB). Relative value show the value when the lowest volume of protein spots in two-dimensional gel is 1.



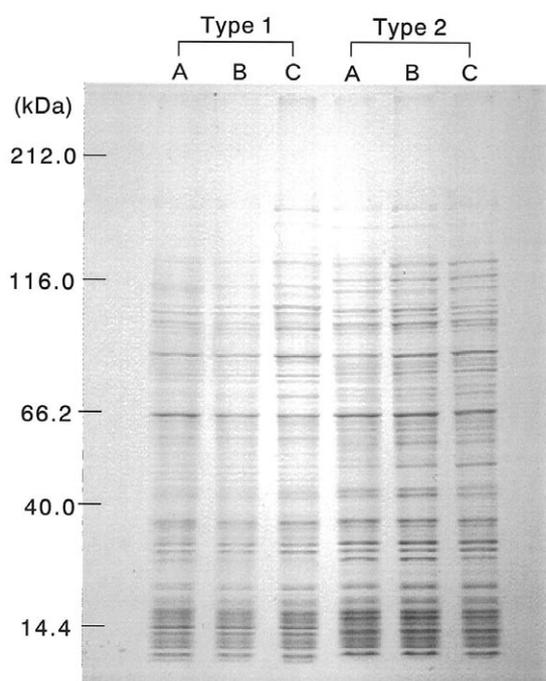
**Fig. 14-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10<sup>7</sup>. The electrophoretograms were detected by silver staining.



**Fig. 14-2** Synthesis level of cellular proteins of non-halophilic psychrotrophic *Vibrio* strain V1605 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10<sup>7</sup>. The electrophoretograms were detected by silver staining. Relative value show the value when the lowest area of protein spots in two-dimensional gel is 1.



**Fig. 15** Isoelectric focusing gel electrophoretograms of cellular proteins of halophilic psychrotrophic *Vibrio* strains V1806 (Type 1 strain) and V114 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (25 °C).



**Fig. 16** Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gel electrophoretograms of cellular proteins of halophilic psychrotrophic *Vibrio* strains V1806 (Type 1 strain) and V114 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (25 °C).

## 考 察

非好塩性 *Vibrio* の菌体タンパク質では、等電点および SDS電気泳動はいずれも 1 型菌ではより鮮明なバンドを認めたのに対し 2 型菌では不鮮明で、この傾向は CBB 染色および銀染色による二次元電気泳動のスポットでも同様であった。これについては、2 型菌では菌体タンパク質が構造的に不安定（三次構造が堅固ではない）であるためと考える。このため分解し易く、したがって 2 型菌の死滅期ではタンパク質の数および量（濃度）とも急速に低下することもよく理解される。しかしながら、好塩性 *Vibrio* では非好塩性 *Vibrio* で見られたこれらの違いは認められず、好塩性 *Vibrio* では 1 型菌および 2 型菌とも構造的にも安定（三次構造が堅固）であると考えられる。

ところで今回、等電点、SDS および二次元電気泳動分析については、菌株および培養齢に関係なく、分析用のタンパク質量は一定とした。ところが、特に非好塩性 *Vibrio* の CBB 染色による二次元電気泳動の結果では、1 型菌では培養齢が増すにつれてタンパク質量（スポット数と濃度）が増加したのに対し、2 型菌では対数期から定常期ではその量が増加したが死滅期では急減した。これについては、1 型菌のタンパク質は対数期では一次および二次構造が多く検出度が低いこと、また培養齢が増すにつれて高次構造化が進み検出度も上がったこと、2 型菌については対数期ですでに高次構造化が進み定常期ではそれが終了し、死滅期ではこの分解により低分子化され二次および一次構造となり、検出度が低くなったと考えられる。

上述のことを考え合わせると、非好塩性 *Vibrio* の 1 型菌では培養齢が増すにつれて構造的に安定したタンパク質の高次構造化が進み、このため生育曲線も生育を通して増加すると考えられた。他方、2 型菌のタンパク質は構造的に不安定なため死滅期では急激な低分子化が進み（自己消化が進み）、このため生育曲線も死滅期では急激に低下すると考えられた。また、好塩性 *Vibrio* のタンパク質は 1 型菌および 2 型菌とも構造的に安定しているが、2 型菌は 1 型菌よりも不安定で、このため 2 型菌の生育曲線は死滅期で減少したと考えられた。

今回、CBB 染色と銀染色で検出されたスポットの種類および同一のスポットではその濃度に違いが見られ、したがって両染色法で検出されるタンパク質の種類が異なることを示唆する。ところで、非好塩性 *Vibrio* の 1 型菌では銀染色よりも CBB で、2 型菌では CBB 染色よりも銀染色で多くのタンパク質が検出され、この傾向は 10 培養で顕著であった。したがって非好塩性 *Vibrio* の 1 型菌では CBB 染色で検出されるタンパク質が、また 2 型菌では銀染色で検出されるタンパク質が多く存在すると考えられる。なお、好塩性 *Vibrio* の 1 型菌と 2 型菌ではこのような違いは見られなかった。

以上のように、非好塩性 *Vibrio* で見られた菌株による生育パターンの違いは細胞構成タンパク質の構造的なあるいは化学的な違いに基づくと考えられた。このことは、1 型菌と 2 型菌では遺伝的に異なる形質をもち、これらの形質は進化的に獲得されたことを示唆する。とくに、非好塩性 *Vibrio*

の2型菌のタンパク質は種類が少なく、しかも限られた範囲のタンパク質が存在し、構造的にも不安定であるとする、2型菌は進化的に移行期の菌群であるとする、とよく理解される。他方、好塩性 *Vibrio* の1型菌と2型菌ではタンパク質の構造あるいは種類に著しい違いがないとすると、これら菌群は進化的に著しい違いはないと考えられた。

#### 文 献

- 1) H. Morii, and H. Sarukawa: Growth pattern and adenosine phosphates in psychrotrophic *Vibrio* spp. at different growth temperatures. *Fish. Sc.*, **60**, 826-833 (2000).
- 2) H. Morii, R. Ishimoto, and Y. Utaida: Growth pattern and adenosine phosphates in psychrotrophic *Pseudomonas* spp. grown under different conditions. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* **88**, 61-70 (2007).
- 3) 石本 亮, 笠間憲太郎, 森井秀昭: 氷蔵および氷冷下のサバにおけるヒスタミン生成と細菌フローラ. *日水誌*, **60**, 763-771 (1994).
- 4) P. H. O'Farrell: High resolution two-dimensional electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021 (1975).
- 5) J. C. Vera: Measurement of microgram quantities of protein by a generally applicable turbidimetric procedure. *Anal. Biochem.*, **174**, 187-196 (1988).
- 6) W. Diezel, G. Kopperschlager, and E. Hofmann: An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of coomassie brilliant blue. *Anal. Biochem.*, **48**, 617-620 (1972).
- 7) U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 8) J. H. Morrissey: Silver stain for proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **117**, 307-310 (1981).

