

第 1 章 緒 論

サバ科魚類など、いわゆる赤身魚の摂食によるアレルギー様食中毒が知られており、その主要原因食からサバ中毒と呼ばれている。その主要な起因物質はヒスタミンであり、ヒスタミン中毒とも呼ばれる。ヒスタミンは動物、植物および細菌に広く分布する生理活性アミンの 1 つであり、生体内でつくられる。よって、魚自身もヒスタミンを産生する。しかしながら、新鮮な魚肉のヒスタミン含量はサバやカツオでもごく僅かで^{6、6²)}、中毒を起こす基準とされている 50 mg%^{2²、3⁸)}以上のヒスタミンの蓄積には細菌が関与する。ところで、これらヒスタミンはヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) によるヒスチジンからの一段階の反応で生成される。他方、これら生成されたヒスタミンは分解されるであろう^{1⁸)}。つまり、魚肉中のヒスタミンの蓄積量は魚肉中に含まれる遊離ヒスチジン量、汚染細菌によるヒスタミン生成能、および生成されたヒスタミンの分解能によって定まる。

魚肉中に含まれる遊離ヒスチジン含量は魚種により異なる^{1⁴)}。また遊離ヒスチジンは腐敗や発酵によるタンパク質の分解でも増加する。ヒスタミンはかつて腐敗毒の一つと見られていたが、これは腐敗による遊離ヒスチジンの増加と関連付けられる。しかしながら、ほとんどのヒスタミン中毒がサバ科魚類のような遊離ヒスチジンをもともと多量に含む魚の摂食で発生している。また、遊離ヒスチジンを多量に含む魚では腐敗が認められる以前に、中毒発症量を超えるヒスタミンが生成される場合も知られている^{1⁵)}。

汚染細菌による魚肉中でのヒスタミン生成能、すなわちヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の産生能および活性は汚染細菌の生育環境に影響される。ヒスタミン生成細菌については多くの報告があるが、細菌の種類と生育環境という観点から腸内細菌を主体とした中温性の陸生細菌、低温性好塩細菌および中温性好塩細菌の 3 つに区分することができ、後の 2 つ菌群は海水環境に分布している。ところで、ヒスタミン生成細菌に関する初期の報告は全てが陸生細菌であり、Mellandby ら^{4²)}

がモルモットの腸内容物からヒスチジンをヒスタミンに変換する細菌を分離して以来、多くの陸生ヒスタミン生成細菌が報告されている^{1)、5)、30)、33)、58)、60)}。中でも1950年代の前半に日本で頻発したアレルギー様食中毒の原因菌として分離された *Proteus morganii* は多量のヒスタミン生成した^{5)、30)、33)}。また、相磯ら¹⁾ は79株のヒスタミン生成菌 (*Escherichia*、*Aerobacter*、*P. mirabilis*、*P. vulgaris*、*P. morganii*、*Pseudomonas*、*Achromobacter* および *Micrococcus*) のヒスタミン生成能を調べ、*P. morganii* が種特異的に多量のヒスタミンを生成することを明らかにした。*P. morganii* は *Morganella morganii* と改名されているが、現在も代表的なヒスタミン生成細菌として知られている。Taylor ら⁶⁰⁾ は食中毒の原因試料 (マグロの刺身) から *Klebsiella pneumonia* を分離し、同菌が食中毒を起こすのに十分な量のヒスタミン (442 mg/100 g) を産生することを観察した。

海洋性ヒスタミン生成細菌、特に低温細菌は *Photobacterium phosphoreum* に限定されている様である。飯田²⁾ はヒスタミンを生成する *P. phosphoreum* を分離し、同菌が10℃以下でも良く生育することから食品衛生上重要であるとしている。van Spreekens⁶¹⁾ は少量の発光細菌で汚染させた真空パックの塩付けニシンで多量のヒスタミンの蓄積を観察した。Okuzumi ら^{47)、48)} は5℃および20℃に貯蔵したサバ肉ホモジネート試料から低温好塩性ヒスタミン生成細菌を分離しN菌群細菌と称した。N菌群細菌は発光とチトクロムオキシダーゼの有無によりI型 (発光+/チトクロムオキシダーゼ+)、II型 (+/-)、III型 (-/+) およびIV型 (-/-) に分かれ、II型は *P. phosphoreum* とした。なお、N菌群細菌は後に遺伝型および表現型分析により *P. phosphoreum* に分類された²⁴⁾。Morii ら^{44)、45)} はサバとニシンの氷冷と10℃貯蔵を行い、皮と内臓から分離した90株の発光細菌のうち85株が *P. phosphoreum* でこれら全てにヒスタミン生成能が見られ、残り5株の発光細菌 *Vibrio logei* と他の非発光細菌にはヒスタミン生成能はなかったと報告している。また、低温貯蔵したサバ肉中のヒスタミン量と *P. phosphoreum* の生育との相関性から、低温貯蔵魚におけ

るヒスタミン生成にはもっぱら *P. phosphoreum* が関与すると述べている。一方、中温性の海洋性ヒスタミン生成細菌としては *Aeromonas histaminum*³⁾、*Vibrio alginolyticus*^{6, 2)} および C 菌^{16, 17)} が報告されている。与口らは C 菌が *P. morganii* に匹敵するほどの強いヒスタミン生成能をもち、夏場の海水や魚に出現し、海水が 20℃ 以下になると減少することを観察している。なお、同菌は遺伝型および表現型分析により *P. damsellae* に分類された³⁵⁾。

ヒスタミン産生に関する研究はほとんどが陸生の中温細菌を対象としたもので、細菌培養や洗浄菌体を用いて HDC 産生能や HDC 活性が調べられている。Koessler ら³⁶⁾ は腸内細菌を用いた実験で、ヒスタミン生成培地は酸性で、グリセロールやグルコースのような容易に利用される炭素原を添加する必要があると報告した。Gale²⁵⁾ は *E. coli* の HDC 産生の至適温度は 20–26℃ であり、37℃ では産生は著しく抑制されるとしている。一方、*Clostridium welchii*¹⁹⁾ では 25℃ より 37℃ の方が良いとしている。河端ら^{7, 8)} は *P. morganii* の脱炭酸酵素形成に関する因子について調べている。その中で、*P. morganii* の脱炭酸酵素の誘導は基質濃度 $2 \times 10^{-3} \text{M}$ (0.03% 程度) 以上、pH 5.0 およびブドウ糖濃度 0.5–2.0% で最大となった。また、同酵素の誘導は 25℃ で最も高く、37℃ では最大値の 1/5 であった。さらに、酵素産生は生育定常期に最大となり、以降は減少した。Kimata ら³⁴⁾ は *P. morganii* およびその洗浄菌体のヒスタミン生成能は酸素で抑制されたが、酸素の影響は酸化性的アミン分解が原因ではないこと、また *E. coli* のヒスタミン生成能は酸素で影響されないことを示した。Alin¹⁸⁾ は *E. coli* および *Salmonella typhi* は若干異なるものの比較的低い pH でヒスチジンを脱炭酸するが、*E. coli* および *Pseudomonas aeruginosa* は中性およびアルカリ性でヒスタミンを分解したと報告している。

低温性細菌のヒスタミン生成に関しては、奥積ら⁴⁾ の N 菌群細菌の I 型 (前述) の液体培養と洗浄菌体を用いた報告がある。その中で、I 型菌の生育至適温度は 20℃ であったが液体培養でのヒスタミン生成の至適温度は 25℃ 以上、生育至適 pH は 6–8 であったが液体培養での

ヒスタミン生成の至適 pH は 5-6、および生育至適 NaCl 濃度は 1-3% であり液体培養でのヒスタミン生成の至適 NaCl 濃度と同様であったとしている。また、洗浄菌体のヒスタミン生成至適温度は 35-40℃、至適 pH は 5.4 および NaCl 濃度はヒスタミン生成と無関係であったとしている。

捕獲後の魚は通常冷凍あるいは冷蔵される。冷凍では細菌の生育は實際上阻止される。一方、冷蔵では中温細菌はほぼ阻止できるが低温細菌は生育し得る。*P. phosphoreum* は冷蔵下で生育できるヒスタミン生成細菌であり、冷蔵魚におけるヒスタミンの蓄積に主体的な役割を果たす。食中毒を引き起こすレベルのヒスタミン生成能も知られている。ところで、ここ 10 年間の日本の厚生労働省による食中毒統計では、ヒスタミン中毒と思われるものは年間数件から 10 件程度であり、低温細菌に起因すると判定できるものは見当たらない。しかし、ヒスタミン中毒は症状が多様で他の病気に誤診されている可能性が指摘されている。また、*P. phosphoreum* は熱に弱い、ヒスタミンは加熱に強く、一旦生成されると加熱調理後も残存する。さらに、ヨーロッパ共同体ではサバ科およびニシン科の魚類についてはヒスタミン含量が平均 100 ppm 以下という輸入制限を設けているが、この量は *P. phosphoreum* が低温貯蔵魚で十分生成し得る量である。したがって、*P. phosphoreum* によるヒスタミン生成条件の把握は食中毒の抑制のみならず水産物の商品価値を維持するためにも不可欠である。

本研究では低温貯蔵魚でのヒスタミン生成とヒスタミン生成菌との関連性、低温貯蔵魚から分離した *P. phosphoreum* の HDC 産生能および HDC 活性に及ぼす環境因子の影響、および *E. coli* へ導入した *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子の発現に関する研究を行った。第 2 章では氷蔵（氷と魚体が直接に接触する）および冷氷（氷と魚体が直接に接触しない）法を用いて保存したサバにおける *P. phosphoreum* の消長とヒスタミン生成との関連性を調べた。第 3 章では *P. phosphoreum* の洗浄菌体と菌体抽出液を用い、ヒスタミン生成に及ぼす物理的および化学的因子の影響を調べた。第 4 章では異なる酸素分圧下で培養した *P.*

phosphoreum の菌体抽出液をゲルろ過し、得られた HDC 画分の活性とその安定性を検討した。第 5 章では培養温度、pH、NaCl 濃度および海水濃度が *P. phosphoreum* の HDC 産生に及ぼす影響を調べた。第 6 章では *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子を導入した *E. coli* を用い、*P. phosphoreum* の HDC 遺伝子が産生する HDC の機能を調べた。加えて、低温性 *P. phosphoreum* の HDC が *M. morgani* などの中温性ヒスタミン生成菌の HDC と進化的にどのような違いがあるのかを分子系統樹を用いて調べた。第 7 章ではこれらを総括した。

第 2 章 氷蔵および氷冷下のサバにおけるヒスタミンの生成

緒 言

低温貯蔵魚におけるヒスタミン生成に *Photobacterium phosphoreum* が関与することは多くの研究者により認められている。飯田²⁾ は海洋性のいわゆる低温性発光細菌 *P. phosphoreum* がヒスタミンを生成することを最初に報告している。van Spreekens^{6 1)} は少量のヒスタミン生成発光細菌で汚染させた真空パックの塩付けニシンの切り身を 4℃で 8 日目保存し、 10^3 mg/100 g のヒスタミンが蓄積されることを観察している。Okuzumi ら^{4 7)} は 5℃および 20℃に貯蔵したサバから低温好塩性ヒスタミン生成菌を分離し、N 菌群細菌と称した。これら細菌は 4 つの菌型に区分され、II 型は *P. phosphoreum* であろうとし、他の菌型の分類学的位置は不明であるとした。また、同氏ら^{4 8)} は 2.5℃に貯蔵したサバ、イワシおよびサンマの魚体には新鮮時に 1~ 10^2 /g、腐敗時には 10^6 ~ 10^8 /g の N 菌群細菌が存在するとし、食品衛生上の重要性を指摘した。さらに、同菌は海産魚の皮膚より腸管に多いことを明らかにしている^{4 9)}。これら N 菌群細菌は、現在では遺伝学的分類により *P. phosphoreum* に帰属されている^{2 4)}。また、Morii ら^{4 5)、4 5)} はサバとニシンの 10℃貯蔵と氷蔵を行い、内臓では両貯蔵下で、表皮については 10℃貯蔵下で発光細菌の生育を認めたが氷蔵下では検出されないこと、またこれらの発光細菌の大半が *P. phosphoreum* で同菌は多量のヒスタミンを生成することを報告している。さらにサバを低温に貯蔵した場合、特に 10℃貯蔵では背部外層筋肉と内臓でのヒスタミン量が極めて多く、その生成には *P. phosphoreum* が主要な役割を演じるとしている。さらに、氷蔵魚の表皮で発光細菌が検出されなかったことについては、発光細菌が海洋細菌であることに起因するとしている。以上のように、低温貯蔵したサバ科魚類におけるヒスタミン生成には *P. phosphoreum* が主要な働きをしているが、鮮魚の貯蔵方法などの違いが、出現する *P. phosphoreum* の数およびヒスタミンの生成に影響することも示唆している。ここでは低温貯蔵魚におけるヒスタミン生成に及ぼす *P. phosphoreum* の役割を確認すると共に、鮮魚の冷蔵

に汎用される氷蔵（魚体を直接水中に埋没）および同温度の氷冷（魚体をビニール袋に入れて水中に埋没）下のサバにおける *P. phosphoreum* の出現とヒスタミン生成との関連性を検討した。

材料と方法

氷蔵および氷冷下のサバにおけるヒスタミン生成に関する実験

氷蔵（魚体を直接水中に埋没）および氷冷（魚体をビニール袋に入れて水中に埋没）したサバ *Scomber japonicus* について生菌数、発光細菌数およびヒスタミン量を経時的に調べた。実験は11月と12月の2度行った。試料のサバは長崎市内の鮮魚店から購入した。サバは貯蔵前（0日目）と貯蔵後（4日間隔で24日目まで）について生菌数、発光細菌数およびヒスタミン量の測定に供した。供試魚は各測定につき3尾を用いた。

生菌数および発光細菌数の測定と菌株の分離

供試魚の表皮（背部）、筋肉（表皮より約5 mm以深の層）および腹壁（腹腔側）について生菌数と発光細菌数の測定と菌株の分離を行った。表皮および腹壁については、滅菌したコルクボーラー（直径2.5 cm）をそれらの表面に密着させ、その部分を10 mlの滅菌した0.1% ペプトン-リン酸緩衝液（pH 7.0）で十分に洗浄して集菌し、菌数測定用試料とした。筋肉については約1 gを正確に計り取り、9 mlの同緩衝液を加え、ポリトロン（Kinematica GmbH, Steinhofhald 20, 6005 Luzern CH）を用いてホモゲナイズした。これらの試料から同緩衝液を用いて10倍段階希釈液を調製し、PYBG寒天平板培地〔0.5%ポリペプトン、0.25%肉エキス、0.25%酵母エキス、0.1%グルコースおよび1.5%寒天を50%海水に溶解（pH 7.09）〕に0.2 mlずつ塗抹し、20℃で培養した。発光細菌数はすべての平板について発光の様子を見ながら12～48時間後に計数し、総生細菌数は5日間培養後に通常法に従い適度なコロニーの生じた平板での計数により算出した。菌株の分離は

総生菌数の測定に供した平板から外観の異なる集落を釣菌し、同組成の平板培地を用いて純粋分離した。発光細菌については総生菌数の測定に供した平板以外からも集菌した。

分離菌の同定

分離菌は Bergey's Manual^{37, 53)} を参考とし清水¹⁰⁾ の同定方式に従い属段階まで、特に発光細菌については Morii ら^{44, 45)} と同様にして種段階までの同定を行った。

ヒスタミン量の測定

サバの背部外層筋肉（表皮から 1-2 mm）、背部内層筋肉（約 5 mm 以深）および腹部筋肉（腹壁から 1-2 mm）中のヒスタミン量、および分離菌培養液中のヒスタミン量を Morii らの方法^{44, 45)} に従って測定した。なお、分離菌培養液中のヒスタミン量については、発光細菌のすべて（*Photobacterium leiognathi* については総生菌数測定用平板から分離した 6 株とその他の平板より分離した 2 株の計 8 株、*P. phosphoreum* については総生菌数測定用平板から分離した 16 株とその他の平板より分離した 12 株の計 28 株）、氷蔵および氷冷下で貯蔵 12 日目以降のヒスタミンの生成を認めた供試魚の各部位から分離した非発光細菌のすべての菌株（153 株）、および貯蔵 8 日目に分離した細菌の半数（計 30 株）について調べた（総計は発光細菌 36 株とその他 183 株）。

結 果

氷蔵および氷冷下のサバの各部位における総生菌数および発光細菌数の経時変化

氷蔵および氷冷したサバの表皮、筋肉（内層）および腹壁における総生菌数と発光細菌数の経時変化を 11 月（実験 I）と 12 月（実験 II）の 2 度調べた。その結果を各々 Fig. 2-1 と Fig. 2-2 に示す。

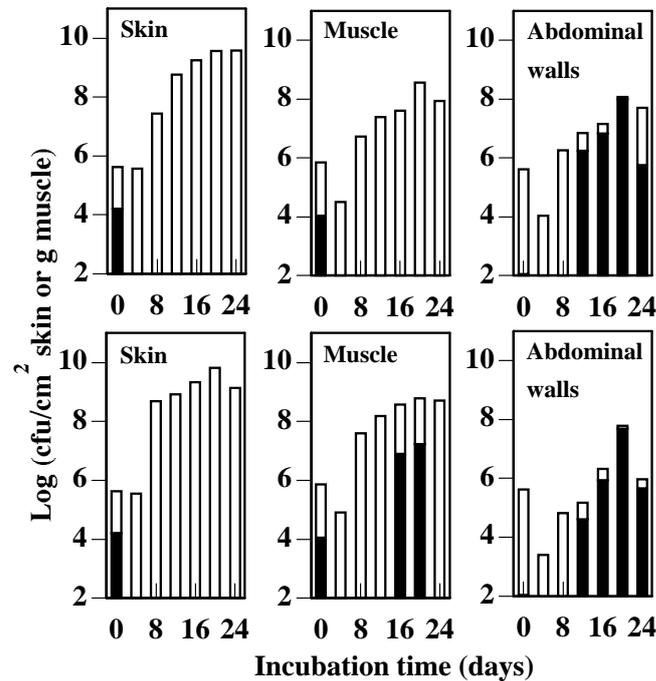


Fig. 2-1. Total viable count and luminous bacterial count in the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls of mackerel during storage in ice (upper) and at the temperature of ice (lower) in Experiment I. Mackerel was stored as touched directly (in ice) and indirectly with ice (at the temperature of ice). The inner layer of muscle is deeper 5 mm from the skin. The counts of bacteria were carried out using PYBG medium [polypeptone, 0.5%; beef extract, 0.25%; yeast extract, 0.25%; glucose, 0.1%; and agar, 1.5% in 50% seawater (pH 7.0)] at 20°C. ■+□, total viable count; ■, luminous bacterial count.

実験 I では発光細菌が検出されたが、実験 II では検出されなかった。総生菌数は発光細菌出現の有無に関わらず、表皮と筋肉では氷蔵魚は氷冷魚より低く、腹壁では高くなり、実験 I と II は同様なパターンを示したが、実験 I の貯蔵魚では実験 II の貯蔵魚に比べて腹壁と筋肉の菌数が極めて高かった。実験 I では貯蔵前は測定に供した全ての部位で発光細菌を認めたが、貯蔵後は氷蔵と氷冷の腹壁および氷冷の筋肉だけに発光細菌を認めた。

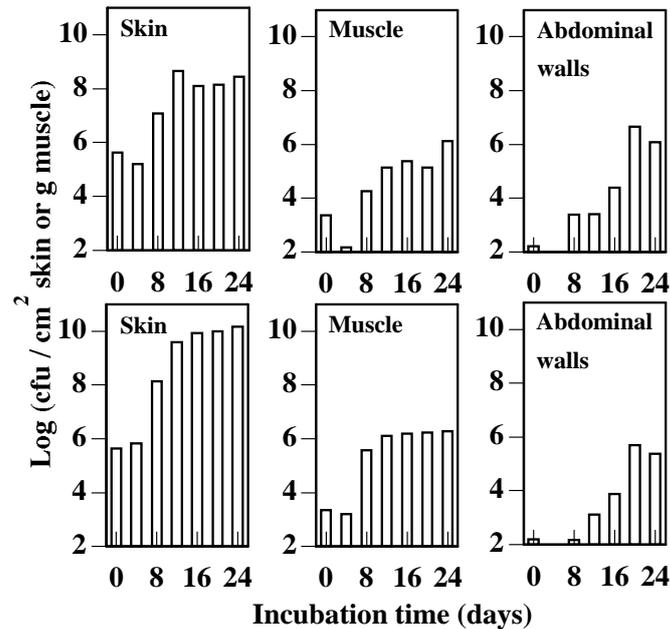


Fig. 2-2. Total viable count in the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls of mackerel during storage in ice (upper) and at the temperature of ice (lower) in Experiment II. Mackerel was stored as touched directly (in ice) and indirectly with ice (at the temperature of ice). The inner layer of muscle is deeper 5 mm from the skin. The counts of bacteria were carried out using PYBG medium [polypeptone, 0.5%; beef extract, 0.25%; yeast extract, 0.25%; glucose, 0.1%; and agar, 1.5% in 50% sea water (pH 7.0)] at 20°C.

貯蔵魚の腹壁ではいずれの貯蔵魚でも 12 日目以降に発光細菌が検出され、20 日目で最大となった。その数は氷蔵下では $9.7 \times 10^7 / \text{cm}^2$ (総生菌数の 80.8%)、氷冷下では $4.9 \times 10^7 / \text{cm}^2$ (総生菌数の 81.7%) であり、供試魚によっては全てが発光細菌で占められた。また、氷冷魚の筋肉では貯蔵 16 日目と 20 日目に各々 $8.0 \times 10^6 / \text{g}$ (総生菌数の 2.1%) および $1.7 \times 10^7 / \text{g}$ (総生菌数の 2.8%) を認めたが、両日とも供試魚 3 匹のうちの 1 匹だけであった。なお、購入直後のサバから分離した発光細菌は *P. leiognathi*、貯蔵後に増殖した発光細菌は *P. phosphoreum* であった。

氷蔵および氷冷下のサバ筋肉におけるヒスタミン量の経時変化

氷蔵および氷冷したサバの背部外層筋肉、背部内層筋肉および腹部

筋肉におけるヒスタミン量の経時変化に関する実験 I の結果を Table 2-1、実験 II の結果を Table 2-2 に示す。

Table 2-1. Histamine development in each layer of the muscles of mackerel stored in ice and at the temperature of ice (Experiment I)						
Storage time (days)	Histamine formed ($\mu\text{g/g}$)					
	In ice			At the temperature of ice		
	Outer muscle	Inner muscle	Ventral muscle	Outer muscle	Inner muscle	Ventral muscle
0	5.9	18.4	16.2	5.9	18.4	16.2
4	6.0	15.0	16.3	6.9	15.4	16.4
8	8.1	13.8	17.3	8.4	16.1	19.0
12	7.1	11.9	17.6	15.1	18.2	20.6
16	6.8	11.9	15.8	19.7	21.6	21.0
20	6.5	11.1	16.3	25.7	26.2	43.6
24	8.0	13.4	16.0	39.3	31.1	124.1

The outer and inner muscles are layer from 1-2 mm and deeper 5 mm from the skin respectively, and the dorsal muscle is layer from 1-2 mm from the abdominal walls. Histamine was determined using the method of Taylor *et al*⁵⁹⁾.

Table 2-2. Histamine development in each layer of the muscles of mackerel stored in ice and at the temperature of ice (Experiment II)						
Storage time (days)	Histamine formed ($\mu\text{g/g}$)					
	In ice			At the temperature of ice		
	Outer muscle	Inner muscle	Ventral muscle	Outer muscle	Inner muscle	Ventral muscle
0	6.7	18.0	16.2	6.7	18.0	16.2
4	6.5	16.5	15.8	7.8	17.2	15.7
8	6.2	14.1	14.8	8.8	15.2	15.5
12	5.2	13.3	15.3	8.8	15.2	15.5
16	5.7	13.5	18.6	8.2	15.2	17.1
20	5.8	15.2	21.0	10.6	17.3	21.9
24	8.3	19.0	28.6	12.9	19.2	24.1

The outer and inner muscles are layer from 1-2 mm and deeper 5 mm from the skin respectively, and the dorsal muscle is layer from 1-2 mm from the abdominal walls. Histamine was determined using the method of Taylor *et al*⁵⁹⁾.

実験 I では、氷蔵魚のいずれの部位でも 24 日間の貯蔵ではヒスタミン量にほとんど増加はなかった。一方、氷冷魚ではいずれの部位でも

12 日目を境としてヒスタミン量は増加し、特に腹部筋肉では 20 日目以降に急増した。しかし、最大でも 12 mg/100 g であり、ヒスタミン中毒の目安とされる 50 mg/100 g^{2, 3, 8)} には達しなかった。実験 II では、腹部筋肉では氷蔵および氷冷とも、その量は増加傾向を示したが、極めて少なかった。なお、購入時の魚のヒスタミン量は僅かであったが、実験 I および II の場合とも、背部内層筋肉、腹部筋肉および背部外層筋肉の順にヒスタミン量は減少し、特に背部外層筋肉ではその値は著しく低かった。

分離菌のヒスタミン生成能

分離菌のヒスタミン生成能を Table 2-3 に示す。

Table 2-3. Histamine formation by bacterial strains isolated		
Bacterial strains	Number of strains	Histamine (mg/100ml)
Luminous bacteria		
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	28	11.3-75.8
<i>Photobacterium leiognathi</i>	8	0.0-0.2
Other bacteria	183	0.0-0.3
<i>P. leiognathi</i> was isolated from mackerel before storage, and <i>P. phosphoreum</i> and other bacteria were isolated from mackerel which formed histamine in significant amount during storage at the temperature of ice. Histamine formation was tested with Moeller's decarboxylase basal medium containing 1% L-histidine at 20°C for 24 h.		

分離した *P. phosphoreum* の全ての菌株にヒスタミン生成能が見られ、培養液 100 ml 当たり 11.3～75.8 mg であった。一方、中温性発光細菌 *P. leiognathi* およびその他の非発光性分離菌はヒスタミン生成能がないか、あってもごく僅かだった。

考 察

1 回目の貯蔵実験で、氷冷魚の筋肉では 12 日目を境としヒスタミンが生成されたが、氷蔵魚では生成されなかった。一方、*P. phosphoreum*

が12日目を境として腹壁で優占的に増殖し、特に氷冷魚では筋肉（内層）でも同菌を確認したが、氷蔵魚の筋肉では確認出来なかった。また、2回目の貯蔵実験では氷蔵および氷冷魚とも腹部筋肉でヒスタミンが生成されたがその値は低く、また *P. phosphoreum* は確認出来なかった。ところで、ヒスタミンの生成を認めた供試魚から分離した菌株のうち、*P. phosphoreum* だけが多量のヒスタミンを生成し、発光細菌 *P. leiognathi* を含む他の菌株はヒスタミンを生成しないか、生成してもその量は少なかった。

以上のことから、実験 I の氷冷下のサバで多量に認めたヒスタミンについては、その大半が *P. phosphoreum* に起因したといえる。また実験 II の、特に腹部筋肉で少量ながら認めたヒスタミンについては *P. phosphoreum* 以外の細菌により生成され、生菌数の増加に伴いその量も増加したと考えられる。

ところで、Okuzumi ら^{47、48、49、50、51}) は赤身魚における発光性と非発光性の低温好塩性ヒスタミン生成菌の存在を報告している。ところが今回、分離菌の中にはヒスタミンを多量に生成する非発光性細菌は確認出来なかった。これについては Okuzumi ら⁴⁹) が開発したヒスタミン生成細菌分離用培地を用いなかったことが原因とも考えられる。しかし、このよう選択培地を用いないために同菌の分離頻度が低くなることはあっても、全く分離されないことはないと思われる。実際、同氏ら^{47、48}) も同選択培地を用いなくても多数のヒスタミン生成細菌を分離しており、32株中20株が非発光性であった。今回分離した非発光細菌の中には多量のヒスタミンを生成する菌株は見られず、優先的に増殖し多量のヒスタミンを生成する細菌はいなかったようである。

Morii ら^{44、45}) は10℃に貯蔵したサバの表皮と内臓で発光細菌の生育とヒスタミンの蓄積を認めている。一方、氷蔵では内臓に発光細菌の生育が見られたが、ヒスタミンの蓄積はなかったとしている。また、氷蔵魚の表皮では発光細菌の生育もヒスタミンの蓄積も認めていない。ところで、海洋性の発光細菌の生育は塩分濃度に影響される。

したがって、淡水氷による氷蔵が *P. phosphoreum* の生育に影響を及ぼすことは充分あり得る。しかし、今回はサバを用いて同様な温度での貯蔵実験を行ったが、氷蔵と氷冷のいずれの表皮でも *P. phosphoreum* の生育は観察されなかった。一方、腹部内壁では両貯蔵下のサバで *P. phosphoreum* が生育したが、有意なヒスタミンの蓄積が氷冷下のサバにだけ認められた。また、本実験は2度行い1度目の実験の氷冷したサバの腹壁からは全ての試料で *P. phosphoreum* が検出されたが、2回目の試料では全く検出されなかった。このことから、低温貯蔵魚における *P. phosphoreum* の生育およびそれに付随するヒスタミンの蓄積に関しては温度、塩分に加え、さらなる要因の関与も考えられた。

要 約

低温性ヒスタミン生成細菌、特に *P. phosphoreum* の生育とヒスタミン生成を調べるために、氷蔵（魚体を直接氷中に埋没）および氷冷（魚体をビニール袋に入れて氷中に埋没）したサバにおける総生細菌数、発光細菌数およびヒスタミン含量を測定した。2度の実験を行い、実験 I では低温貯蔵に伴い *P. phosphoreum* の生育とヒスタミンの蓄積を認めたが、実験 II では *P. phosphoreum* の生育もヒスタミンの蓄積も認めなかった。

発光細菌が生育した実験 I のサバでは、氷蔵および氷冷のいずれも表皮では *P. phosphoreum* の生育を認めず、腹壁では認めた。また、腹壁では氷冷したサバではヒスタミンの有意な蓄積を認めたが、氷蔵では認めなかった。さらに、供試魚から分離し、測定に供した菌株で *P. phosphoreum* は高いレベルのヒスタミンを生成したが、*P. leiognathi* および非発光細菌はヒスタミンを生成しないか、してもごく僅かであった。

以上より、氷点付近に貯蔵したサバでは *P. phosphoreum* の生育やヒスタミン生成が抑制されたが、*P. phosphoreum* が主体的なヒスタミン生成菌であることには変わりなかった。また、その生育やヒスタミン

生成に温度および塩分に加え、さらなる要因の関与が考えられた。

第3章 *Photobacterium phophoreum* のヒスタミン生成に及ぼす 要因の影響

緒 言

第2章では *Photobacterium phosphoreum* が氷温下で生育し、また低温貯蔵した魚でのヒスタミン生成に主体的な役割を果たすことを述べたが、同時に同菌の出現およびヒスタミンの蓄積には温度と塩分に加え、さらなる生育環境条件が関連するとした。ところで、奥積ら⁴⁾は低温好塩性ヒスタミン生成細菌 (N 菌群細菌) の液体培養と洗浄菌体を用いてヒスタミン生成に及ぼす温度、pH および NaCl 濃度の影響を調べている。

今回、低温貯蔵下のサバから分離した *P. phosphoreum* の洗浄菌体に加え、菌体抽出液を用い、同菌のヒスタミン生成反応での温度、pH、NaCl 濃度および基質濃度の影響、および同菌のヒスタミン生成能に及ぼす培養条件、すなわち培養齢、グルコース添加および酸素分圧の影響を検討した。

材料と方法

供試菌

第2章で示した実験で、氷冷中のサバから分離した *P. phosphoreum* のうち、ヒスタミン生成能の最も高かった1菌株を用いた。

供試菌の各環境下での生育量の測定

ヒスタミン生成に及ぼす因子の影響を調べる実験に対応した培地と条件により、供試菌を 20℃ (培養温度での違いを調べる実験は除く) で 18 時間培養 (培養時間での違いを調べる実験は除く) 後、生育量を 600 nm での吸光度測定により調べた。

洗浄菌体によるヒスタミン生成の測定

洗浄菌体は供試菌のヒスタミン生成反応での温度、pH、NaCl 濃度および基質濃度の影響に関する実験とヒスタミン生成能に及ぼす培養齢

の影響に関する実験で用いた。洗浄菌体は、L-ヒスチジン 1.0%と NaCl 2.5%を添加した Moeller の培地^{4 2)}を用い、25℃で 24 時間静置培養(培養齢に関する実験は除く)した供試菌の菌体を、遠心分離 (8,000 回転で 17 分)して集め、2% NaCl 水溶液で 3 回洗浄して調製した。ヒスタミン生成反応に関する実験では、得られた菌体を 2% NaCl 水溶液に懸濁し、その 1 ml を 1 ml の L-ヒスチジン (0.1 mg/ml:基質濃度の影響に関する実験では 10 倍段階の濃度で 0.01~1000 µg/ml) および 2.0% NaCl (NaCl 濃度の影響に関する実験では 1%間隔で 1~5%) 添加 McIlvaine 緩衝液 (0.1 M で pH は 6.2:pH の影響に関する実験では 0.5 間隔で pH 5.5~7.5) と混合し、25℃ (温度の影響に関する実験では 5℃間隔で 20~50℃) の湯浴中で反応させた。1 時間経過後、直ちに氷水中で急冷し、4℃で 15 分間遠心分離 (24,150×g) し、得られた上清のヒスタミン量を Taylor の方法^{5 9)}で測定した。ヒスタミン生成活性は湿重量 1 g の菌体が 1 時間に生成するヒスタミン量で著わした。

ヒスタミン生成能に及ぼす培養齢の影響に関する実験では、6 時間間隔で 48 時間まで、25℃下で静置した液体培養から洗浄菌体を調製し、その 2% NaCl 懸濁液 1 ml を 1 ml の L-ヒスチジン (0.1 mg/ml) および 2.0% NaCl 添加 McIlvaine 緩衝液 (0.1 M で pH は 6.2) と混合し、25℃の湯浴中で 1 時間反応させた。

菌体抽出液によるヒスタミン生成の測定

菌体抽出液は供試菌のヒスタミン生成反応での温度、pH および NaCl 濃度の影響に関する実験とヒスタミン生成能に及ぼすグルコース添加培養および培地の酸素分圧の影響に関する実験で用いた。菌体抽出液の調製では、まず 0.2% L-ヒスチジンを含む SWYP 培地を用い (ただし、培地へのグルコース添加の影響実験では、これに 0.1%グルコースを添加)、洗浄菌体によるヒスタミン生成測定実験の場合と同様に菌体を得た。これを 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) に懸濁し、氷冷しながら超音波破碎 (トミー精工株式会社のモデル UR-200P を用い、出力 5 で破碎) した。さらに破碎した細胞断片を遠心分離 (17,000×g

で 30 分) で除き、その上清液を菌体抽出液とした。

ヒスタミン生成反応に関する実験では、0.5 ml の菌体抽出液 (反応直前に蒸留水で適度に希釈して使用: NaCl 濃度の影響に関する実験では終濃度が 1% 間隔で 1~5%) を L-ヒスチジン (0.1 mg/ml) を含む McIlvaine 緩衝液 (0.1 M で pH は 6.2: pH の影響に関する実験では 1 間隔で pH 4.0~8.0) 0.5 ml と混合し、25°C (温度の影響に関する実験では 10°C 間隔で 10~50°C) で 1 時間反応させた。沸騰水中で反応を停止し、ヒスタミン量を Taylor の方法^{5,9)} で測定した。ヒスタミン生成活性は湿重量 1 g の菌体が 1 時間に生成するヒスタミン量で著わした。

ヒスタミン生成能に及ぼすグルコース添加培養の影響に関する実験では、12 時間間隔で 48 時間まで、25°C 下で静置した液体培養から菌体抽出液を調製した。また、培地の酸素分圧の影響に関する実験では 20°C で 24 時間培養したが、好気培養は好気震盪とし、嫌気培養は Gas Pak 法 (BBL) を用いた。各菌体抽出液 0.5 ml を L-ヒスチジン (0.1 mg/ml) を含む McIlvaine 緩衝液 (0.1 M で pH は 6.2) 0.5 ml と混合し、25°C で 1 時間反応させた。

結 果

ヒスタミンの生成反応に及ぼす温度の影響

供試菌 *P. phosphoreum* の洗浄菌体および菌体抽出液によるヒスタミン生成反応および同菌の生育に及ぼす温度の影響を Fig. 3-1 に示す。供試菌の生育至適温度は 25°C で、35°C 以上では生育しなかった。一方、ヒスタミンの生成至適温度は洗浄菌体で 35°C、菌体抽出液で 40°C であった。また、両者とも僅かではあったが 50°C でもヒスタミンの生成を認めた。

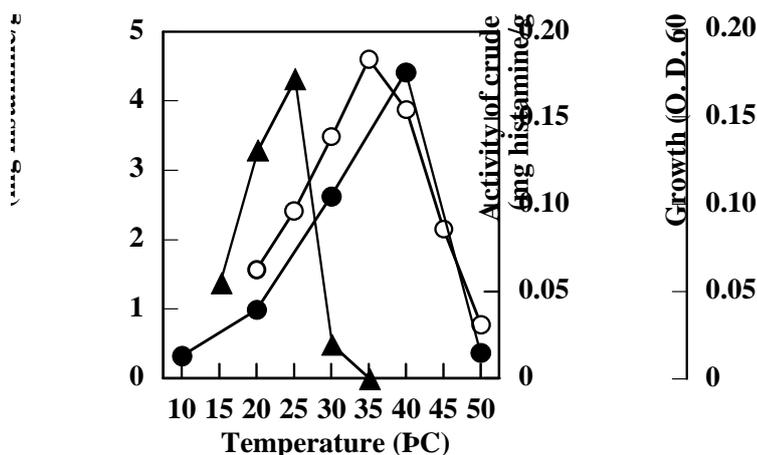


Fig. 3-1. The effects of the reaction temperature on histamine formation by washed cell suspensions (○) and crude extracts (●) of *Photobacterium phosphoreum* isolated from mackerel. The washed cell suspensions were prepared by washing harvested cells with 2% NaCl solution and suspending the washed cells in the same solution. The crude extracts were prepared by breaking cells suspended in an acetate buffer (pH 6.2) in ice with an ultrasonic machine (20 kHz, 5 min) and centrifuging (24, 150 × g, 15 min, 4°C) the broken cell suspensions to remove the debris. The cells were prepared from 24 h cultures at 25 (for the washed cell suspensions) or 20°C (for crude extracts). The cultures were grown with Moeller's decarboxylase basal medium containing 1.0% L-histidine and 2.5% NaCl (for the washed cell suspensions) or SWYP broth⁴⁵⁾ containing 0.2% L-histidine (for the crude extracts). The reaction for histamine formation was performed at 25°C using McIlvaine buffer containing 2% NaCl, pH 6.2 (for the washed cell suspensions) or acetate buffer, pH 6.2 (for the crude extracts). The histamine level was determined using the method of Taylor *et al.*⁵⁹⁾ Growth (▲) of the bacterium in each temperature is also presented. The culture was incubated with SWYP broth for 18 h.

ヒスタミンの生成反応に及ぼす pH の影響

供試菌 *P. phosphoreum* の洗浄菌体および菌体抽出液によるヒスタミン生成反応および同菌の生育に及ぼす pH の影響を Fig. 3-2 に示す。培地の初発 pH が 4.5 以下での生育は極度に抑制され、pH 5.5～8.0 では良好な生育を認めた。ヒスタミン生成の反応至適 pH は洗浄菌体および菌体抽出液のいずれも pH 6.0 付近が最大で、pH 8.0 では生育が良

いにも関わらずヒスタミンの生成を認めなかった。

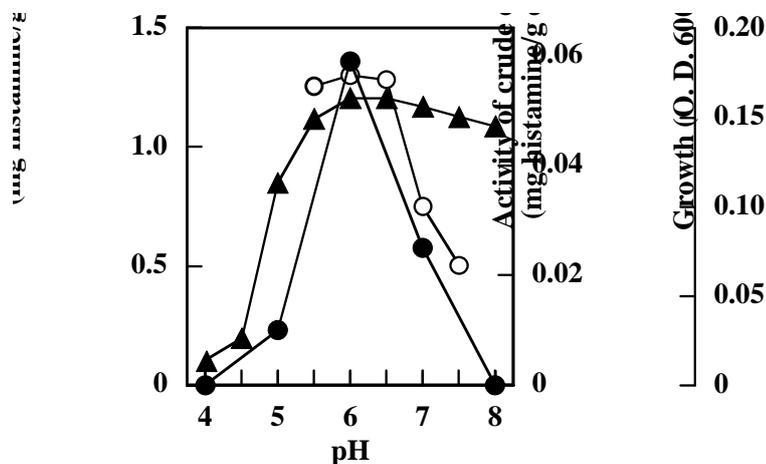


Fig. 3-2. The effects of reaction pH value on histamine formation by washed cell suspensions (○) and crude extracts (●) of *Photobacterium phosphoreum* isolated from mackerel. Growth (▲) of the bacterium in each pH value is also presented. The culture was incubated with yeast peptone broth⁴⁵⁾ containing 2.5% NaCl in each pH value at 25°C for 18 h.

ヒスタミンの生成反応に及ぼす NaCl 濃度の影響

供試菌 *P. phosphoreum* の洗浄菌体および菌体抽出液によるヒスタミン生成反応および同菌の生育に及ぼす NaCl 濃度の影響を Fig. 3-3 に示す。NaCl 濃度 2~4% で生育が良好だった。1 および 5% では生育が著しく抑制され、0% では生育しなかった。洗浄菌体によるヒスタミン生成反応に及ぼす NaCl 濃度の影響は生育の場合とほぼ同様であった。一方、菌体抽出液によるヒスタミン生成は NaCl 無添加で最大となり、NaCl 濃度の増加に伴い漸減し、洗浄菌体の場合とは異なった。

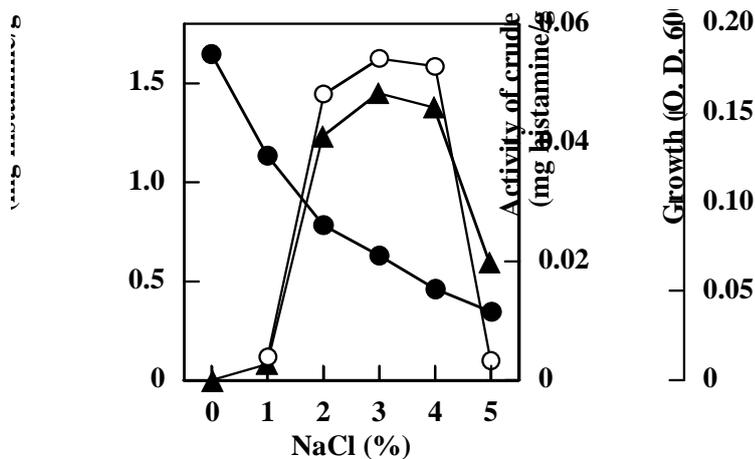


Fig. 3-3. The effects of the reaction NaCl concentration on histamine formation by washed cell suspensions (○) and crude extracts (●) of *Photobacterium phosphoreum* isolated from mackerel. Growth (▲) of the bacterium in each NaCl concentration is also presented. The culture was incubated with yeast peptone broth⁴⁵⁾ in each NaCl concentration at 25°C for 18 h.

ヒスタミンの生成反応に及ぼす基質濃度の影響

供試菌 *P. phosphoreum* の洗浄菌体によるヒスタミン生成反応に及ぼす基質 (L-ヒスチジン) 濃度の影響を Table 3-1 に示す。

Histidine added (μg/ml)	Histamine formed (μg/g cells/h)	
	0°C	25°C
1000	392	1,574
100	37	165
10	25	46
1	23	32
0.1	22	29
0.01	21	28

Histamine formation by washed cell suspensions; see Fig. 3-1.

反応温度が 0 および 25°C のいずれの場合も、基質のヒスチジン濃度が 1000 および 100 μg/ml ではヒスチジン濃度と生成されたヒスタミ

ン量に相関性が見られた。また、洗浄菌体によるヒスタミン生成量は0℃でも25℃の1/4程度あった。

ヒスタミン生成能に及ぼす培養齢の影響

供試菌 *P. phosphoreum* での培養時間の違いに基づく洗浄菌体のヒスタミン生成能と生育曲線を Fig. 3-4 に示す。

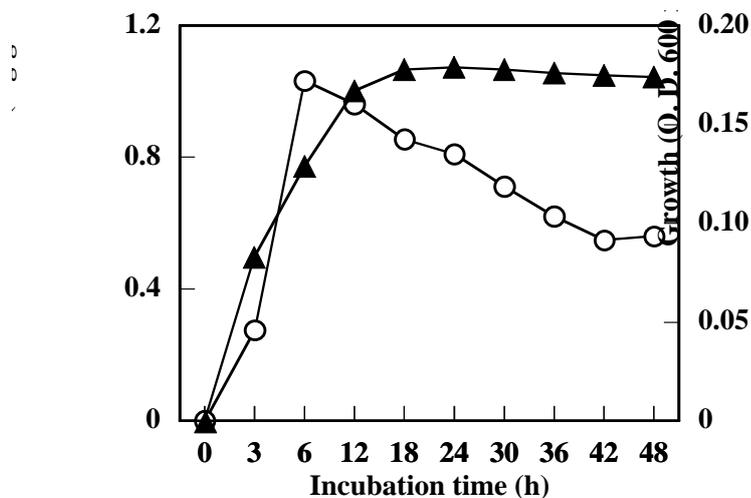


Fig. 3-4. The effects of the culture age on histamine formation by washed cell suspensions (○) of *Photobacterium phosphoreum* isolated from mackerel.

A growth curve (▲) of the bacterium is also presented. The culture was incubated with SWYP broth at 25°C.

洗浄菌体のヒスタミン生成能は対数増殖後期で最大となり、以後は徐々に低下した。

ヒスタミン生成能に及ぼすグルコースの影響

供試菌 *P. phosphoreum* のグルコース添加および無添加培養での菌体抽出液のヒスタミン生成能、同培養液の pH および同培地での生育曲線を Fig. 3-5 に示す。

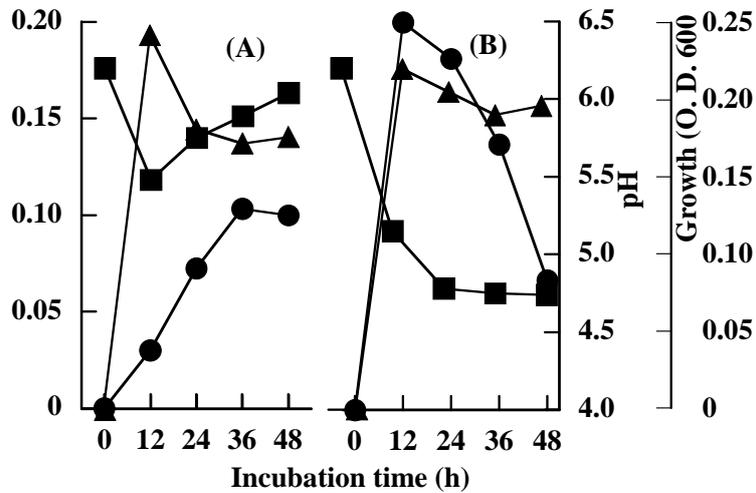


Fig. 3-5. The effects of the presence of glucose in the culture media on histamine formation (●) by crude extracts of *Photobacterium phosphoreum* isolated from mackerel, variation of pH value (■) in the culture media, and growth curves (▲) of the bacterium. The cultures were incubated with SWYP broth in the absence (A) and the presence (B) of 1% glucose at 25°C.

培養 12 時間目ではグルコース無添加培養より添加培養で生育が抑制された。グルコース無添加培養では pH が一時的に pH 5.47 まで低下したが以降は上昇した。一方、ヒスタミン生成能は徐々にではあるが上昇し 36 時間で最大となった。グルコース添加培養では培養 12 時間目で pH は 5.15 まで低下し、最終的に 4.7 程度で安定した。一方、ヒスタミン生成能力は急上昇し、12 時間培養ではグルコース無添加培養での最大値の約 2 倍に達し、以降は低下した。

ヒスタミン生成能に及ぼす酸素分圧の影響

供試菌 *P. phosphoreum* の好気および嫌気培養での菌体抽出液のヒスタミン生成能と同培養環境下での生育曲線を Table 3-2 に示す。生育量では好気培養は嫌気培養の 3 倍であったが、得られた菌体抽出液のヒスタミン生成量は嫌気培養では好気培養での約 2 倍であった。

Table 3-2. The effects of the oxygen tension of the culture on histamine formation by crude extracts of <i>Photobacterium phosphoreum</i> isolated from mackerel		
Condition	Growth (O.D. 600 nm)	Histamine formed ($\mu\text{g/g cells/h}$)
Aerobic	0.75	599
Anaerobic	0.25	1,229

Histamine formation by crude extracts: see Fig. 3-1.

Anaerobic culture was incubated with SWYP broth⁴⁵⁾ containing 0.2% histidine using BBL anaerobic jar and Gas-pack anaerobic envelopes and aerobic culture using a rotary shaker at 20°C for 24 h.

考 察

奥積ら⁴⁾は分離した低温好塩性細菌（現在 *P. phosphoreum* に帰属されているがオキシダーゼ陽性）の洗浄菌体によるヒスタミン生成反応の至適温度を 35～40℃としている。今回分離した *P. phosphoreum*（オキシダーゼ陰性）の洗浄菌体によるヒスタミン生成反応の至適温度もこれとほぼ同様の 35℃であった。ところが、同菌はこの温度では生育できない。一方、同菌の菌体抽出液によるヒスタミン生成反応の至適温度もこれらとほぼ同様の 40℃であった。以上のことから、*P. phosphoreum* の細胞は生育出来ない高い温度でも活発にヒスタミンを生成する。また、供試菌の洗浄菌体によるヒスタミン生成反応の至適温度は中温細菌 *Escherichia coli*^{2,5)} や *Proteus morganii*^{2,0)} などと同様であり、生育環境温度との関連性は見られなかった。ところで、異なる温度で培養し調製した洗浄菌体では、*P. morganii*^{8, 2,0)} や *E. coli*^{2,5)} では生育至適温度より低い 25℃前後で培養し調製した洗浄菌体でヒスタミン生成活性は最大となり、培養温度が高くなるにつれてその活性は低下するとされている。これは本酵素の産生誘導が 25℃前後で最大となることを示唆する。

供試菌の洗浄菌体は反応 pH が 5.5～6.5 の酸性域でヒスタミン生成

活性が高く、また生育が活発であった pH 7 以上では急減した。既報の低温性ヒスタミン生成菌の洗浄菌体のヒスタミン生成反応の至適 pH は 5.4⁴⁾、中温性ヒスタミン生成菌の *P. morganii*^{7、20)} や *P. vulgaris*⁷⁾ でも pH 6.0~6.5 である。また、いずれもアルカリ側でその活性は急激に低下しており、今回の結果と類似した。一方、供試菌の菌体抽出液のヒスタミン生成反応の至適 pH も 6.0 であった。以上のことから、洗浄菌体の酸性域での高いヒスタミン生成活性は HDC の反応至適 pH を反映する。ところで、*P. morganii*^{8、20)} を異なる pH で培養した場合、ヒスタミン生成能は pH 5 前後で最大となり、培養 pH の上昇に伴いその活性は低下するが、pH 7 あるいはそれ以上のアルカリ性でもかなり高い活性を示す。つまり、HDC を産生誘導するための至適 pH は HDC の反応至適 pH とは異なると判断された。

ヒスタミン生成反応に及ぼす NaCl 濃度の影響については、洗浄菌体では 2~4% NaCl でヒスタミン生成活性が高く、1 および 5% NaCl ではその活性は極めて低かった。これは生育の傾向と類似した。一方、菌体抽出液では NaCl 無添加でヒスタミン生成活性が最大となり、NaCl 濃度の増加に伴いその活性は漸減し、洗浄菌体の場合とは異なった。この結果は、供試菌の HDC が菌体中では何らかの保護作用を受けていることを意味しており、供試菌のヒスタミン生成能を左右する一要因として興味深い。ところで、奥積ら⁴⁾ が低温好塩性ヒスタミン生成細菌のヒスタミン生成活性を洗浄菌体で調べた結果では、NaCl 濃度による活性の差異を認めず、今回の結果とは異なった。

ヒスタミン生成反応に及ぼす L-ヒスチジン濃度の影響については、その濃度が 100 µg/ml 以上では濃度に比例してヒスタミン生成量も増えた。ところで、このヒスタミン生成活性測定実験には洗浄菌体を用いた。このことから *P. phosphoreum* の細胞が 0.01% 程度以上のヒスチジン濃度を認識できること、換言すればこの濃度が HDC の産生誘導に必要な基質濃度と考えられる。ところで、Gale²⁵⁾ は *E. coli* のヒスチジン脱炭酸能が培地中に添加したヒスチジン量に応じて高まるとし、また Eitenmiller²¹⁾ は *P. morganii* では培地のヒスチジン濃度

が 0.07% で最大のヒスタミン生成能を示したとしている。

ヒスタミン生成能に及ぼすグルコースの影響については、グルコース添加培地では無添加培地に比べてヒスタミン生成能は極めて高くなり、また pH の急激な低下と若干の生育抑制が見られた。これはグルコース添加により培地の pH が低下し、その結果として生育の抑制とヒスタミン生成能の上昇が起こったと考えられる。Gale^{2 5)} は *E. coli* ではグルコース添加培養でヒスタミン生成能が増すことを述べている。また、反応液へのグルコース添加で同酵素活性には変化が見られなかったことから、培地へのグルコース添加に伴う同酵素活性の上昇については、グルコースそのものに起因するのではなく、pH の低下に起因するとしている。一方、河端ら⁸⁾ はグルコース添加に伴う同酵素の産生促進は pH の低下だけでは説明されないとしている。

ヒスタミン生成能に及ぼす培地の溶存酸素の影響については、嫌気培養は好気培養に比べてヒスタミン生成能は有意に高かった。Kimata ら^{3 4)} は *P.morganii* では通気培養は嫌気培養や好気培養に比べてヒスタミン生成量は少なく、その原因は HDC が酸素により分解もしくは不活性化されるためとしている。また、Ferencik^{2 3)} は *Hafnia* sp. では嫌気培養は好気培養よりヒスタミン生成は緩やかであるとしている。一方、Gale^{2 5)} は *E. coli* によるヒスタミン生成量が嫌気および好気下で有意な違いはなかったとしている。何れにしても、起源の異なる HDC は各々の特徴を有しており、顕著なヒスタミン生成細菌については個々に特徴付けを行う必要があると思われる。

要 約

低温貯蔵下のサバから分離した *P. phosphoreum* の洗浄菌体と菌体抽出液のヒスタミン生成反応での温度、pH、NaCl 濃度および基質濃度の影響、および同菌のヒスタミン生成能に及ぼす培養条件、すなわち培養齢、グルコース添加および酸素分圧の影響について調べた。

供試菌の生育至適温度は 25℃ で、35℃ 以上では生育しなかった。一

方、ヒスタミンの生成至適温度は洗浄菌体で 35℃、菌体抽出液で 40℃であった。培地の初発 pH が 5.5-8.0 では良好に生育し、4.5 以下の生育は極度に抑制された。ヒスタミン生成は洗浄菌体および菌体抽出液ともに pH 6.0 付近で最大となり、pH 8.0 では生育が良いにも関わらずその生成を認めなかった。NaCl 濃度 2-4% では生育が良好で、1 および 5% では著しく抑制され、0% では生育しなかった。洗浄菌体によるヒスタミン生成に及ぼす NaCl 濃度の影響は生育の場合とほぼ同様であったが、菌体抽出液の場合は NaCl 無添加でヒスタミン生成活性が最大となり、NaCl 濃度の増加に伴い漸減し、洗浄菌体の場合とは異なった。供試菌のヒスタミン生成能は対数増殖後期で最大となり、以後は徐々に低下した。グルコース添加培養で培地の pH 低下と若干の生育抑制を認めたが、HDC 産生能の最大値はグルコース無添加培養の約 2 倍に達した。嫌気培養での供試菌の HDC 産生能は好気培養の約 2 倍となった。

第4章 *Photobacterium phosphoreum* の二つのヒスチジン脱炭酸酵素の生成とその活性に及ぼす培養酸素分圧の影響

緒言

第3章では、*Photobacterium phosphoreum* のヒスタミン生成能、すなわちヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の産生能が培地の酸素分圧に影響されることを述べたが、HDC に及ぼす酸素の影響に関しては相反する結果が報告されている^{23, 25, 34})。また供試菌の菌体抽出液を凍結保存したとき、保存当初では菌体抽出液中の HDC 活性は低下するが以降はほぼ一定となったことから、安定性の異なる複数の HDC の存在を予測させた。また、これまでに報告されている HDC は例外なくオリゴマー酵素であり、*Klebsiella planticola* の HDC についてはダイマーとオリゴマーの2つの活性型が報告されている^{27, 53, 56, 57})。そこで、本章では *P. phosphoreum* の HDC の多形性と酸素の影響について検討した。

材料と方法

細菌、培地および生育条件

供試菌としては、氷冷したサバから分離した *P. phosphoreum* NUFM 262 株を用いた。供試菌の培養には通常、ヒスチジン添加 SWYP 液体培地 [0.5% バクトペプトン (Difco)、0.3% 酵母エキス粉末 (Oxoid) および 0.2% L-ヒスチジン (和光) を 75% 熟成ろ過海水中に溶解 (pH 6.2)] を用い、必要に応じて L-ヒスチジン無添加で使用した。また特記しない限り、20°C で 24 時間培養した。好気培養は静置、攪拌および震盪下で行った。攪拌速度は菌体が適度に懸濁される程度とし、また震盪速度は 120 および 133 回転/分 (直径 6.7 cm) で行った。嫌気培養はガスパック (BBL) を用いた嫌気ジャー中に静置して行った。

異なる酸素分圧で生育した *P. phoshoreum* の菌体抽出液の HDC 活性の測定

供試菌の培養は嫌気静置、好気静置および好気震盪（120 回転／分）下で行った。生育量は培養の濁度（600 nm の吸光度）と細胞湿重量で測定した。HDC 活性は細胞の湿重量（g）および培養液量（100 ml）当たりの活性で示した。

菌体抽出液の調製

供試菌の培養は 500 ml 容三角フラスコに入れた 200 ml のヒスチジン添加 SWYP 液体培地を用い、1 回分の菌体抽出液の調製には通常培養液 800 ml を用いた。菌体抽出液の調製は、まず液体培養した菌体を遠心分離（13,000×g で 15 分）し、少量の 0.1 M 酢酸緩衝液（pH 6.2）に懸濁した。次に、懸濁菌体を氷冷しながら超音波破碎（トミー精工株式会社のモデル UR-200P を用い、出力 5 で破碎）した。破碎した細胞断片を遠心分離（17,000×g で 30 分）で除き、その上清液を菌体抽出液とした。

HDC 活性の測定法

酵素液 0.3 ml、0.1 M 酢酸緩衝液（pH 6.2）0.5 ml および 50 mM ジチオトレイトール（DTT）あるいは蒸留水 0.1 ml の混合液に、0.1 ml の L-ヒスチジン溶液（10 mg/ml）を添加し、直ちに混合した後、25℃で反応させた。反応は沸騰水中に 5 分間漬けて停止した。対照試験は L-ヒスチジン添加前に酵素を加熱失活させた。生じたヒスタミンは Taylor の方法^{5,9)} で測定した。酵素 1 単位は 25℃で 1 時間に 1 μmole のヒスタミンを生成する酵素量とした。

タンパク質量の測定

タンパク質量は Lowry 法^{3,9)} で測定した。ゲルろ過カラムからの溶出液のタンパク質量については 280 nm の吸光度を調べた。

ゲルろ過による HDC の分画と分子量の推定

菌体抽出液の 7 ml を 0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) で平衡化した Sepharose CL-6B カラムに充填し (直径 2.6、高さ 96 cm)、同緩衝液で展開した。特記しない限り、緩衝液には 5 mM DTT を混合した。流速 31.6 ml/時間で展開し、溶出液の 7.8 ml を分画した。HDC の分子量はチログロブリン (MW: 669,000)、フェリチン (MW: 440,000)、カタラーゼ (MW: 232,000)、牛血清アルブミン (MW: 67,000)、キモトリプシノゲン A (MW: 25,000) および N-2,4-ジニトロフェニル-L-アラニン (MW: 255.2) との相対溶出容量から推定した。

酵素の安定性試験

冷蔵、透析、ゲルろ過および -20°C 保存における菌体抽出液の安定性、並びに好気震盪 (120 回転/分) および嫌気静置培養菌体抽出液をゲルろ過して得られた分画酵素の安定性に及ぼす DTT の影響を調べた。つまり 7 日間の冷蔵および冷凍、0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) での 18 時間の透析、および Sepharose CL-6B ゲルろ過前後における、好気静置培養菌体抽出液の HDC の安定性を DTT の有無で調べた。加えて 7 日間の冷蔵、0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) での 18 時間の透析、および Sepharose CL-6B ゲルろ過前後における、好気震盪 (120 回転/分) および嫌気静置培養菌体抽出液をゲルろ過して得た分画 HDC の安定性を DTT の有無で調べた。この安定性試験における操作は特記しない限り 4°C で行った。

結 果

各酸素分圧下での *P. phosphoreum* の生育とヒスタミン生成

異なる酸素分圧下で培養した *P. phosphoreum* の生育曲線を Fig. 4-1 に示す。吸光度および細胞湿重量のいずれを用いた測定でも、生育は好気振盪培養で極めて良好で、続いて好気静置培養および嫌気静置培養の順に悪くなったが、後 2 者は好気振盪培養より著しく劣った。

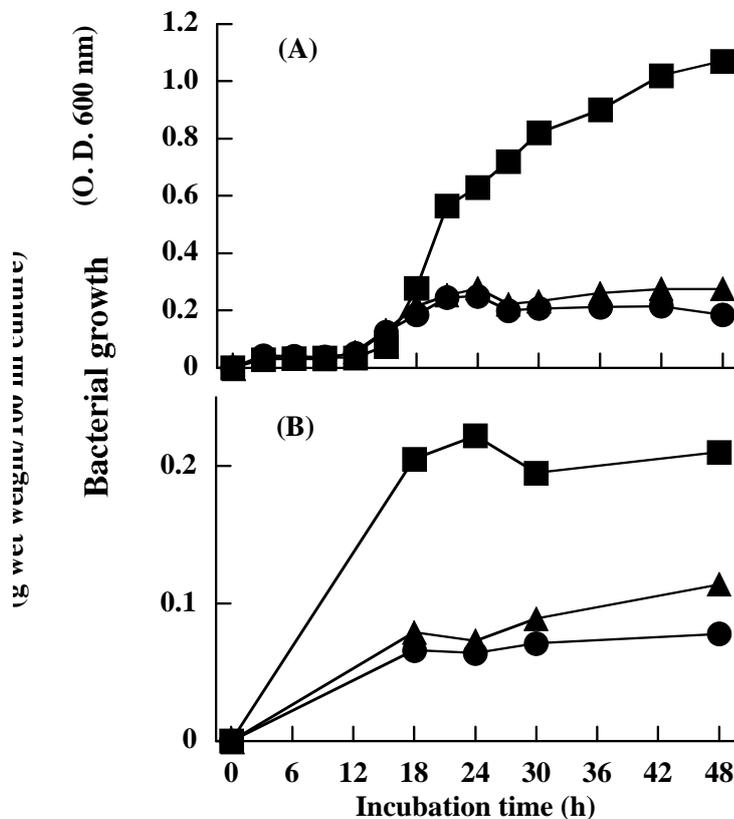


Fig. 4-1. Growth curves of *Photobacterium phosphoreum* incubated in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 20°C under different oxygen tensions.

Growth was monitored by turbidimetry (A) and gravimetry (B).

Growth conditions: ■, aerobic shaking (at 120 rpm); ▲, aerobic stationary; ●, anaerobic stationary.

異なる酸素分圧下で培養した *P. phosphoreum* からの菌体抽出液の HDC 活性の生育に伴う変化を Fig. 4-2 に示す。培養液当たりのヒスタミン生成活性は、好気振盪培養は好気静置および嫌気静置培養に比べて極めて高かった（最大値での比較で 1.8 倍程度）。これに反し、細胞湿重量当たりのヒスタミン生成活性は、嫌気静置培養で最大となり、好気静置培養および好気振盪培養がこれに続いたが、好気振盪培養は前二者に比べて極めて低く（最大値の比較で約 1/2 倍）、これは生育量とほぼ逆の傾向となった。

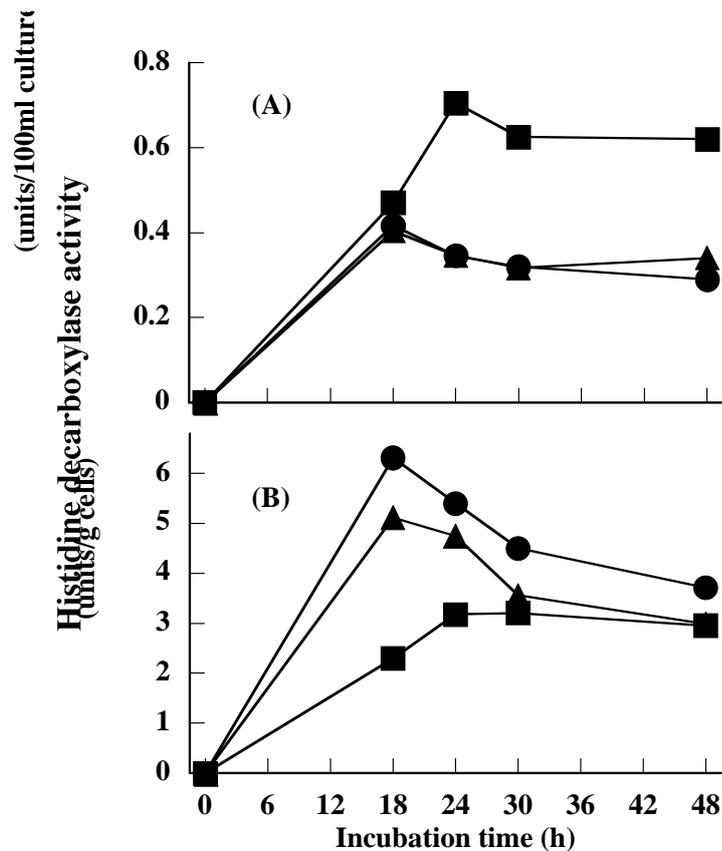


Fig. 4-2. Changes in histidine decarboxylase formation by *Photobacterium phosphoreum* during growth in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 20°C under different oxygen tensions. Histidine decarboxylase formation is shown as a unit of the enzyme per volume of broth culture (A) and unit of the enzyme per wet weight of cells (B). One unit was defined as the amount of enzyme that formed 1 μ mole of histamine at 25°C for 1 h. Growth conditions: ■, aerobic shaking (at 120 rpm); ▲, aerobic stationary; ●, anaerobic stationary.

各酸素分圧下で培養した *P. phosphoreum* の HDC

ヒスチジン添加培地を用い、嫌気静置、好気静置、好気攪拌および好気振盪下で培養した *P. phosphoreum* の菌体抽出液のゲルろ過の結果を Fig. 4-3a~4-3e に示す。菌体抽出液のゲルろ過では HDC 画分と思われる 3 つのピーク (I, II および III) が見られた。しかし、ピーク III 画分はその溶出位置 (N-2, 4-DNP-alanine より遅く溶出し、細胞由来のヒスタミンを含むと推定される) から、HDC の活性ピークではあり得ない。ピーク I 画分の活性は嫌気静置、好気静置、好気攪拌、

好気振盪（120 回転/分）および好気振盪（133 回転/分）培養の順に高くなったが、ピーク II 画分はこの逆であった。また、この時のピーク I 画分と II 画分活性に占めるピーク II 画分活性の割合は

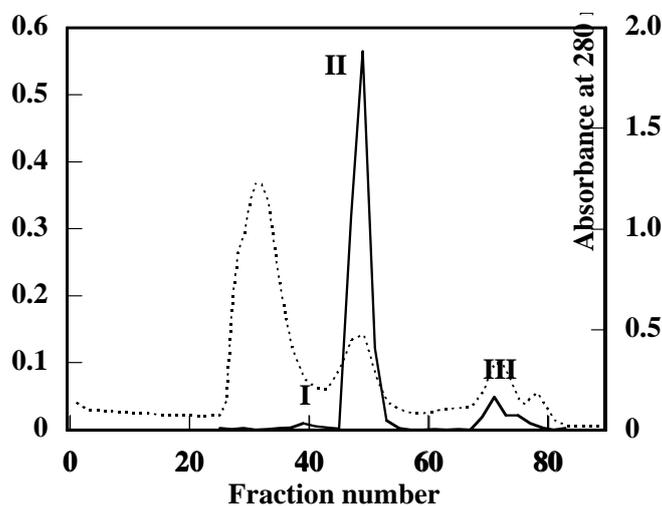


Fig. 4-3a. Sepharose CL-6B gel filtration of the crude extract of *Photobacterium phosphoreum* grown in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 20°C for 24 h under anaerobic stationary condition.

—, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm .

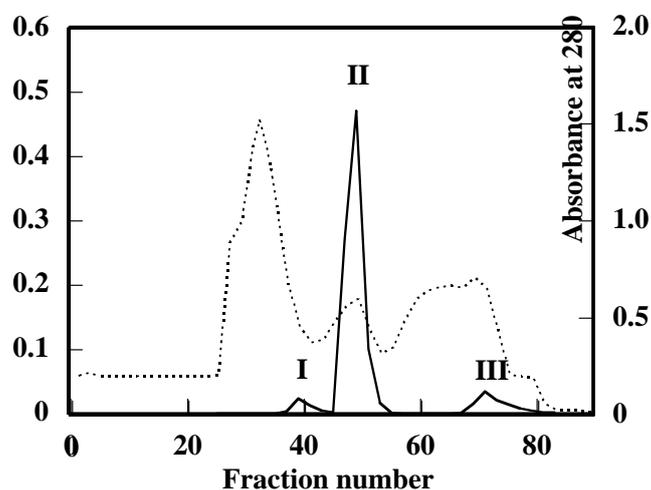


Fig. 4-3b. Sepharose CL-6B gel filtration of the crude extract of *Photobacterium phosphoreum* grown in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 20°C for 24 h under aerobic stationary condition.

—, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm .

嫌気静置および好気静置培養では各々98%および95%を占め、逆に好気振盪（133回転/分）培養では95%がピークI画分であった。

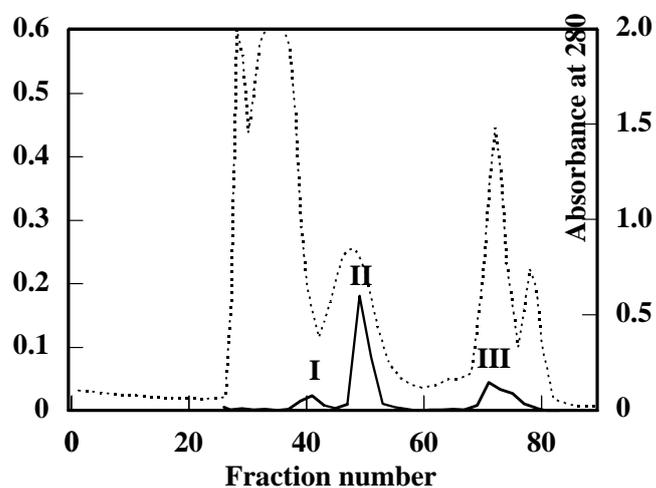


Fig. 4-3c. Sepharose CL-6B gel filtration of the crude extract of *Photobacterium phosphoreum* grown in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 20°C for 24 h under aerobic spinner condition.
—, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm .

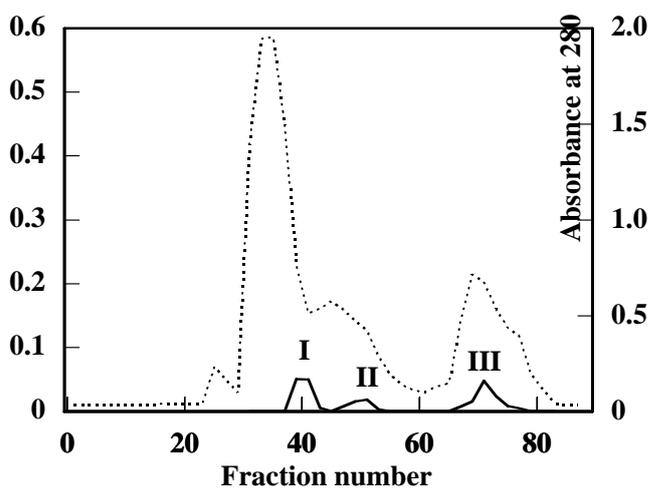


Fig. 4-3d. Sepharose CL-6B gel filtration of the crude extract of *Photobacterium phosphoreum* grown in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 20°C for 24 h under aerobic shaking condition (at 120 rpm).
—, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm .

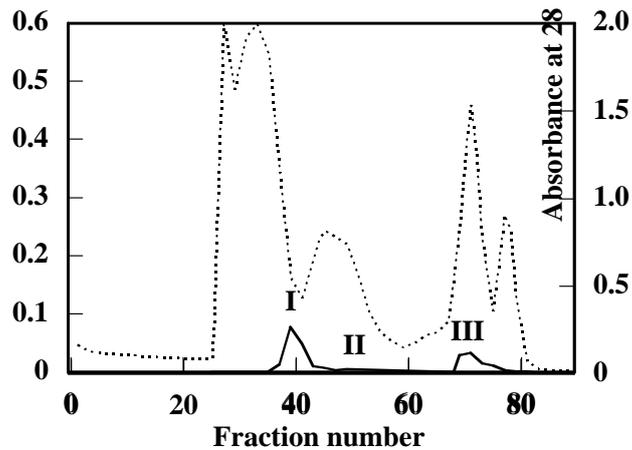


Fig. 4-3e. Sepharose CL-6B gel filtration of the crude extract of *Photobacterium phosphoreum* grown in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 20°C or 24 h under aerobic shaking condition (at 133 rpm).

—, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm.

ヒスチジン添加培地を用い、異なる酸素分圧下で培養した *P. phosphoreum* の菌体抽出液からゲルろ過での HDC の回収結果を Table 4-1 に示す。

Table 4-1. Recovery of histidine decarboxylase on Sepharose CL-6B gel filtration of the crude extract from <i>Photobacterium phosphoreum</i> grown in the presence of histidine under different oxygen tensions				
Growth condition	Histidine decarboxylase activity applied			Recovery (%)
	Total (units*)		Specific (units/mg)	
Anaerobic stationary	23.8		1.22	68.3
Aerobic:				
Stationary	23.6		0.93	60.1
Spinner	15.1		0.16	36.3
Shaking (at 120 rpm)	19.5		0.29	10.8
Shaking (at 133 rpm)	22.9		0.22	11.2
Culture was grown in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 20 °C for 24 h.				
* One unit is defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mole of histamine at 25 °C for 1 h.				

攪拌培養を除き、タンパク量当たりの HDC 活性およびその回収率は嫌気静置、好気静置、好気攪拌、好気振盪（120 回転 / 分）および好気振盪（133 回転/分）培養の順に低下した。嫌気静置培養で得た菌体の抽出液からゲルろ過での HDC の回収率は 68.3%であったが、その

98%はピーク II 画分であり、したがって低い酸素分圧下での培養ではピーク II 画分が全 HDC 酵素の大部分を占めた。

HDC 産生に及ぼすヒスチジンの影響

ヒスチジン無添加培地を用い、好気静置下で培養した *P. phosphoreum* の菌体抽出液のゲルろ過の結果を Fig. 4-4 に、また同ゲルろ過での HDC の回収結果を Table 4-2 に示す。

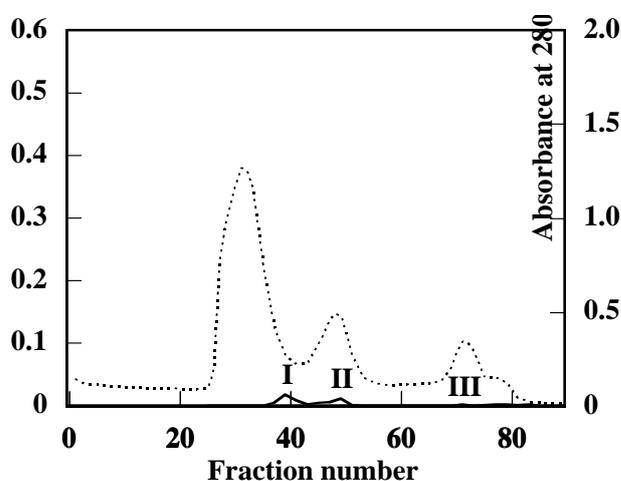


Fig. 4-4. Sepharose CL-6B gel filtration of the crude extract of *Photobacterium phosphoreum* grown in SWYP medium (the absence of L-histidine) at 20°C for 24 h under aerobic stationary condition.

—, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm.

Growth condition	Histidine decarboxylase activity applied		Recovery (%)
	Total (units*)	Specific (units/mg)	
Aerobic stationary	4.8	0.19	18.9

Culture was grown in SWYP medium at 20 °C for 24 h.
 * One unit is defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mole of histamine at 25°C for 1 h.

ヒスチジン無添加培地で培養した菌体の抽出液の場合はヒスチジン添加培地でのそれに比べると、ピーク I には大差がなかったがピーク II が激減し、また酵素の回収率も低かった。

菌体抽出液中の HDC の安定性に及ぼす DTT の影響

好気静置培養した *P. phosphoreum* からの菌体抽出液の HDC 活性の安定性に及ぼす DTT の影響試験の結果を Table 4-3 に示す。4℃で7日間の冷蔵、-20℃で7日間の冷凍、4℃で18時間の透析および4℃下のゲルろ過のいずれも、DTT の添加で HDC 残存活性は高く維持された。

Table 4-3. Effect of dithiothreitol (DTT) on the stability of histidine decarboxylase of the crude extract from <i>Photobacterium phosphoreum</i> grown under aerobic stationary condition					
Treatment	Enzyme activity (units* × 10)				
	Absence of DTT		Presence of DTT		
	Before treatment	After treatment	Before treatment	After treatment	
Cooling at 4 °C for 7 days	1.76	0.00 (0.0)	1.87	1.13 (60.5)	
Freezing at -20 °C for 7 days	1.76	1.11 (63.2)	1.87	1.58 (84.7)	
Dialysis at 4 °C for 18 h	0.86	0.33 (37.9)	0.86	0.43 (49.8)	
Gel filtration on					
Sepharose CL-6B at 4 °C	24.47	1.61 (6.6)	71.40	42.6 (59.7)	
Culture was grown in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 20 °C for 24 h.					
* One unit is defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mole of histamine at 25 °C for 1 h.					
The data show the total activity in the gel filtration and the activity per milliliter of the used sample in the other treatments, and in parentheses the percentage of the residual activity per the original enzyme activity.					

ピーク I 画分と II 画分の HDC 活性の安定性に及ぼす DTT の影響

好気振盪および嫌気静置培養した *P. phosphoreum* からの菌体抽出液をゲルろ過して得られた2つの HDC 画分の安定性に及ぼす DTT の影響試験の結果を Table 4-4 に示す。好気振盪および嫌気静置培養菌体抽出液のいずれも、ピーク I 画分と II 画分は DTT で同様な影響を示した。つまり4℃で7日間の冷蔵で、DTT 無添加ではピーク I 画分の HDC 活性は50%程度および II 画分では35%程度まで減少した。他方 DTT 添加

では、ピーク I 画分の HDC 活性はかなり失われたが、II 画分ではそのほとんどが維持された。

Table 4-4. Effect of DTT on the stability of two histidine decarboxylases of <i>Photobacterium phosphoreum</i> grown under aerobic and anaerobic conditions					
		Enzyme activity (units* × 100 / ml)			
Growth condition	Peak	Before cooling	After cooling at 4 °C for 7 days		
			Absence of DTT	Presence of DTT	
Aerobic shaking (at 120 rpm)	I	1.83	0.80 (44)	0.40 (22)	
	II	0.76	0.24 (32)	0.73 (96)	
Anaerobic stationary	I	1.20	0.67 (56)	0.16 (14)	
	II	7.18	2.68 (37)	7.13 (99)	

Culture was grown in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 20 °C for 24 h.
 * One unit is defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mole of histamine at 25 °C for 1 h.
 The data show activity per milliliter of the used sample and in parentheses the percentage of the residual activity per the original enzyme activity.

ピーク I 画分と II 画分の HDC 活性の安定性に及ぼす透析の影響

好気振盪および嫌気静置培養した *P. phosphoreum* からの菌体抽出液をゲルろ過して得られた 2 つの HDC 画分の安定性に及ぼす冷蔵と透析の影響試験の結果を Table 4-5 に示す。なお、今回の HDC 画分の安定性に及ぼす冷蔵の影響試験は、HDC 画分の安定性に及ぼす透析の影響試験の対照試験として行った。好気振盪および嫌気静置培養菌体抽出液のいずれも、4°C で 18 時間冷蔵したピーク I 画分と II 画分および 4°C で 18 時間透析したピーク I 画分では HDC 活性の 90% 以上が維持されたが、4°C で 18 時間透析したピーク II 画分では HDC 活性は完全に失活した。

Table 4-5. Effect of dialysis on the stability of two histidine decarboxylases of <i>Photobacterium phosphoreum</i> grown under aerobic and anaerobic conditions				
Growth condition	Peak	Enzyme activity (units* × 100/ml)		
		Before treatment	After cooling at 4°C for 18 h	After dialysis at 4°C for 18 h
Aerobic shaking (at 120 rpm)	I	1.83	1.68 (92)	1.62 (89)
	II	0.76	0.69 (91)	0.00 (0)
Anaerobic stationary	I	1.20	1.12 (94)	1.13 (95)
	II	7.18	6.54 (91)	0.00 (0)

Culture was grown in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 20 °C for 24 h.
 * One unit is defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mole of histamine at 25 °C for 1 h.
 The data show activity per milliliter of the used sample and in parentheses the percentage of the residual activity per the original enzyme activity.

ピーク I 画分と II 画分の HDC の分子量

ゲルろ過で分画したピーク I およびピーク II の HDC の分子量は、チログロブリン (MW : 669,000)、フェリチン (MW : 440,000)、

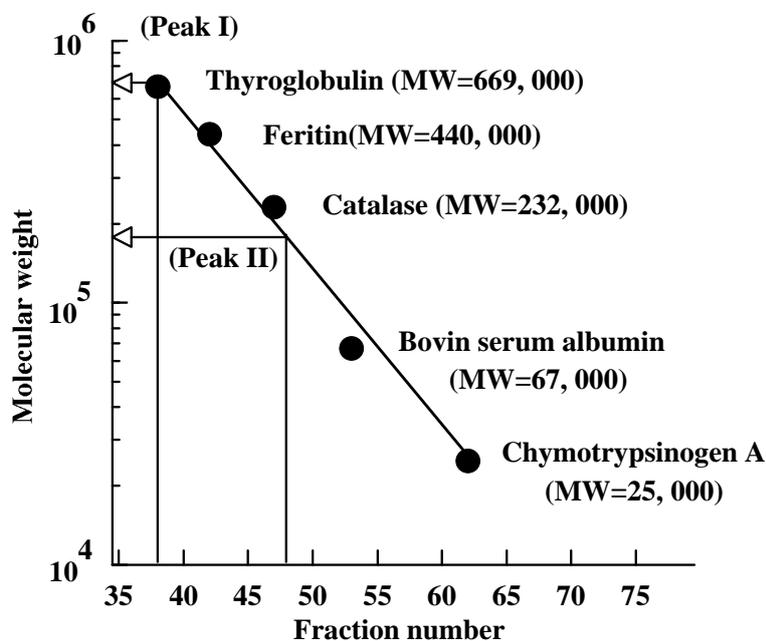


Fig. 4-5. Estimation of molecular weight of histidine decarboxylase from *Photobacterium phosphoreum* by Sepharose CL-6B.

カタラーゼ (MW: 232,000)、牛血清アルブミン (MW: 67,000)、キモトリプシノゲン A (MW: 25,000)、および N-2,4-ジニトロフェニル-L-アラニン (MW: 255.2) との相対溶出容量 (Fig. 4-5) から各々約 700,000 および約 170,000 と推定された。

考 察

供試 *P. phosphoreum* からの菌体抽出液の細胞湿重量当たりの HDC 活性は嫌気静置培養菌体で最も高く、好気静置培養菌体および好気震盪菌体がこれ続いた。同様な結果は *P. morganii* でも報告されている^{3,4)}。また、同菌体抽出液の HDC 比活性も嫌気静置および好気静置培養菌体は好気攪拌および好気震盪培養菌体に比べて著しく高かった。ところで、*P. phosphoreum* は魚の表皮、内臓、ときには筋肉で増殖する。そして動物は死後、暫くは還元状態が保たれている。したがって、魚の表皮、内臓および筋肉は *P. phosphoreum* がヒスタミンを生成する環境としては、酸素分圧から見る限りでは良好な環境と言えそうである。

ピーク II 画分の HDC は、L-ヒスチジン添加培地を用いた好気静置培養菌体では多量に産生されたが、L-ヒスチジン無添加培地のそれではほとんど産生されなかった。よって、ピーク II 画分の HDC は誘導酵素と判断された。他方、ピーク I 画分の HDC は、培地への L-ヒスチジンの添加に関わらず、産生される酵素の活性はほとんど変わらないことから構成酵素と判断された。しかし、この酵素活性は低いため今後詳しい検討を要する。ピーク I 画分の HDC 活性は 4°C で 18 時間保存および透析で若干の活性低下が見られた。しかしながら、ピーク II 画分の HDC 活性は 4°C で 18 時間保存では活性低下は少なかったが、透析でその活性は完全に失活した。これは透析で DTT が除かれたためと判断される。

ピーク I 画分の HDC 活性は、DTT 添加は無添加に比べ、4°C で 7 日間保存での活性が低かったことから、ピーク I 画分の HDC はピーク II

画分の HDC とは異なり DTT によりむしろ不安定化されるようである。ところで、菌体抽出液中の HDC 活性は 4℃ 保存、-20℃ 保存、4℃ での透析および 4℃ でのゲルろ過のいずれも、DTT 添加は無添加に比べ、その活性は高かった。これは、今回用いた好気静置培養菌体からの抽出液の多くが、ピーク II 画分の HDC から成ることから考えると、妥当な結果であろう。

今回、異なる酸素分圧下で培養した菌体からの抽出液のゲルろ過は DTT を添加して行った。したがって、ゲルろ過で溶出したピーク II 画分の HDC は比較的安定な状態、ピーク I 画分の HDC はやや不安定な状態で実施したことになる。今回、培養した酸素分圧の増加に伴い、菌体抽出液の HDC のゲルろ過での回収率が減少した。これについては、培養した酸素分圧が上昇するにつれて、DTT 存在下でも不安定なピーク I 画分の HDC の割合が増加したためと考えられる。このことは、好気静置培養した菌体の抽出液をゲルろ過したときに失われた HDC 活性は約 40% で、また DTT 無添加で透析したときの残存活性も約 40% であり、他方ピーク II 画分の HDC 活性は透析で失活したことから、この残存活性はピーク I 画分の HDC に由来すると考えられることから、その妥当性が示唆される。ところで、一般的に食品の真空パックやガス置換包装は細菌数の増加を抑制する。おそらく、*P. phosphoreum* の生育も抑制される。しかしながら、HDC の産生の誘導促進、すなわちヒスタミンの生成を助長する可能性を考慮する必要がある。

要 約

異なる酸素分圧下で培養した *P. phosphoreum* の 2 つの HDC の活性とそれら酵素の特性を調べた。供試 *P. phosphoreum* はより好気状態で活発に生育したが、HDC 産生能はより嫌気状態で高かった。同菌は推定分子量 700,000 の構成的 HDC と 170,000 の誘導性 HDC を産生し、誘導性 HDC はより嫌気状態で多く産生された。誘導性 HDC は DTT で安定化されたが、構成的 HDC はむしろ DTT の存在で若干不安定であった。以

上より、誘導性 HDC の産生および活性は酸素により阻害されると判断された。これは、炭酸ガス封入パックした鮮魚の低温保存は *P. phosphoreum* によるヒスタミンの生成を助長する可能性を示唆した。

第 5 章 *Photobacterium phosphoreum* のヒスチジン脱炭酸酵素産生に及ぼす物理的および化学的因子の影響

第 1 節 *Photobacterium phosphoreum* のヒスチジン脱炭酸酵素産生に及ぼす温度、pH および NaCl 濃度の影響

緒 言

第 3 章では *Photobacterium phosphoreum* の洗浄菌体および菌体抽出液によるヒスタミン生成について述べた。また、第 4 章では *P. phosphoreum* が構成的ヒスチジン脱炭酸酵素（構成的 HDC）と誘導性 HDC を産生し、誘導性 HDC の産生や活性が酸素により抑制されるが、構成的 HDC は抑制されないことを述べた。ところでこれまで、ヒスタミン中毒の原因菌を始めとして、多くのヒスタミン生成細菌のヒスタミン生成に及ぼす温度、pH などの影響が報告されているが、その生成の測定にはほぼ洗浄菌体を用いている^{4、9、21、25、34}。またこれまで報告された細菌由来の HDC は誘導酵素と考えられており^{26、27}、構成酵素を合わせもつという報告は見当たらない。そこで本章では、*P. phosphoreum* の菌体抽出液を用い、HDC の産生に及ぼす温度、pH および塩濃度の影響を調べると共に、この影響に構成的および誘導性 HDC がどのように関わっているかを調べた。

材料と方法

細菌、培地および生育条件

氷冷したサバから分離した *P. phosphoreum* NUFM 262 株を用いた。この培養には通常、ヒスチジン添加 SWYP 液体培地 [0.5% バクトペプトン (Difco)、0.3% 酵母エキス粉末 (Oxoid) および 0.2% L-ヒスチジン (和光) を 75% 熟成ろ過海水に溶解 (pH 6.2)] を用い、また特記しない限り培養温度は 20°C とした。異なる生育条件における HDC の産生を

調べる実験の培養温度は 4、7、15、20、25 および 27°C とした。培地の初発 pH は 0.5 間隔で 5.0–8.0 に調整した。培地の NaCl 濃度の影響を調べる実験では 75% 海水の代わりに 1、3 および 5% NaCl 溶液を用いた。

対照として用いた *Morganella morganii* IFO 3848 は 0.2% L-ヒスチジン添加 YE ブロス [1.0% ポリペプトン (日本製薬) および 0.2% 酵母エキス粉末 (Difco) を蒸留水に溶解 (pH 6.2)] を用い 37°C で培養した。

菌体抽出液の調製

供試菌の培養は 500 ml 容三角フラスコに入れた 200 ml の液体培地を用い、通常 *P. phosphoreum* からの菌体抽出液の調製には 1 回 800 ml の培養液、および *M. morganii* では 400 ml の培養液を用いた。菌体抽出液の調製は液体培養した菌体を遠心分離 (13,000×g で 15 分) し、少量の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) に懸濁した。細胞は氷冷しながら超音波破碎 (トミー精工株式会社のモデル UR-200P を用い、出力 5 で破碎) した。細胞断片を遠心分離 (17,000×g で 30 分) して除き、その上清液を菌体抽出液とした。

HDC 活性の測定

酵素液 0.3 ml、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) 0.5 ml および 50 mM ジチオトレイトール (DTT) 0.1 ml の混合液に 0.1 ml の L-ヒスチジン溶液 (10 mg/ml) を添加し混合し、25°C で反応させた後、沸騰水中に 5 分間漬けて反応を停止した。空試験は L-ヒスチジン添加前に酵素を加熱失活させて行った。生じたヒスタミンは Taylor の方法^{5,9)} で測定した。酵素 1 単位は 25°C で 1 時間に 1 μmole のヒスタミンを生成する酵素量とした。

タンパク量の測定

タンパク質の定量は Lowry 法^{3,9)} で行った。ゲルろ過カラムからの

溶出液のタンパク質量の測定は 280 nm の吸光度を調べた。

ゲルろ過および構成的 HDC と誘導性 HDC 画分の調製

菌体抽出液の 7 ml を 5 mM の DTT を含む 0.02 M に酢酸緩衝液 (pH 6.2) で平衡化した Sepharose CL-6B カラム (96×2.6 cm) に充填し、同緩衝液で展開した。流速 31.6 ml/時間で展開し、溶出液の 7.8 ml を分画した。

各温度、pH および NaCl 濃度における HDC 活性の測定

基本的には上記した“HDC 活性の測定”の項目に記載した方法に従った。反応温度の影響を調べる実験では 10℃ 間隔で 0～60℃ の活性を測定した。pH の影響を調べる実験では 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) の代わりに McIlvain 緩衝液 (0.1 M クエン酸 + 0.2 M リン酸塩) を用い、pH 1 の間隔で 5～8 の活性を測定した。NaCl 濃度の影響を調べる実験では NaCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) を用い、反応液の終 NaCl 濃度が 0.5% 間隔で 0～2.5% になるように調整した。

結 果

P. phosphoreum と *M. morgani* の HDC 活性

P. phosphoreum と *M. morgani* の菌体抽出液のゲルろ過の結果を Fig. 5-1 と Fig. 5-2 に示す。*P. phosphoreum* の構成的 HDC はゲルろ過での分画番号 37～43 (ピーク I 画分)、また誘導性 HDC は 47～53 (ピーク II 画分) に溶出した。なお、分画番号 67～75 の範囲にピーク (ピーク III) を認めしたが、これについてはその分子量から HDC ではない。他方、*M. morgani* の菌体抽出液のゲルろ過で得た HDC 活性のピークは 1 つだけで、その分画番号は *P. phosphoreum* のピーク II のそれと一致した。このピーク II 画分は L-ヒスチジン無添加培地で培養した *M. morgani* では確認できなかった。したがって、*M. morgani* が産生する HDC は誘導酵素であり、またこのピーク II 画分が誘導性 HDC であ

ることは *P. phosphoreum* でも認めている。

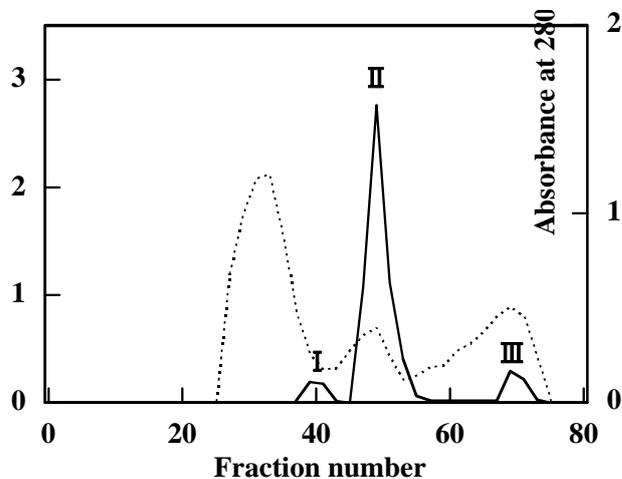


Fig. 5-1. Typical elution profile of *Photobacterium phosphoreum* histidine decarboxylase from a Sepharose CL-6B column. Crude extracts applied to the column were prepared from *P. phosphoreum* grown in SWYP broth containing 0.2% L-histidine at 20°C for 24 h under aerobic stationary conditions.

—, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm.

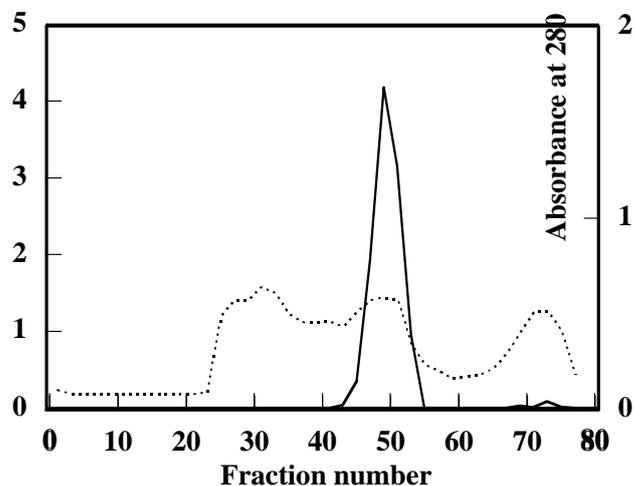


Fig. 5-2. Typical elution profile of *Morganella morganii* histidine decarboxylase from a Sepharose CL-6B column. Crude extracts applied to the column was prepared from *M. morganii* grown in YP broth containing 0.2% L-histidine at 37°C for 24 h under aerobic stationary conditions.

—, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm .

様々な培養条件で生育した *P. phosphoreum* の HDC 活性

様々な温度、pH および NaCl 濃度下で培養した *P. phosphoreum* の菌体抽出液のタンパク質含量、HDC の総活性と比活性およびゲルろ過で分画した構成的 HDC と誘導的 HDC の割合を各々 Table 5-1、5-2 および 5-3 に示す。

異なる温度下で培養した菌体からの抽出液に関しては (Table 5-1)、HDC の比活性は 7°C で培養した菌体では最も高く、15°C～25°C 培養菌体がこれに続き、4°C と 27°C 培養菌体では極めて低かった。また構成的 HDC と誘導性 HDC の割合を見ると、7°C～25°C 培養菌体では誘導性 HDC が 83～93% を占め誘導性 HDC の割合は 7°C 培養菌体で最も高かった。なお、4 および 27°C 培養菌体では誘導性 HDC はそれぞれ 61% および 37% に低下し、4°C 培養では生育速度の低下および 27°C 培養では生育抑制が示唆された。

Temperature (°C)	Incubation period (days)	Crude extract			% activity of HDC		HDC recovery (%)
		Protein content (mg)	Total HDC (units*)	Specific activity (units/mg)	Constitutive enzyme (%)	Inducible enzyme (%)	
4	9	24.2	7.1	0.29	39	61	60
7	3	25.7	37.9	1.47	7	93	65
15	1	27.3	17.5	0.64	11	89	64
20	1	26.3	16.3	0.62	17	83	54
25	1	25.8	17.2	0.67	11	89	55
27	1	19.4	5.0	0.26	63	37	64

HDC, histidine decarboxylase.
* One unit is defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mole of histamine at 25°C for 1 h.

異なる pH で培養した菌体からの抽出液に関しては (Table 5-2)、HDC の比活性は pH 6.0 での培養菌体で最も高く、それ以下の pH での培養菌体では急激に低下し、それ以上の pH での培養菌体では徐々に低下した。これは供試菌のヒスタミン生成能が pH 6.0 で最も高く、それ以下では急激に低下し、それ以上では徐々に低下することを示している。pH 5.0～8.0 での培養では、pH の上昇に伴い誘導性 HDC の割合が増加し、pH の低下に伴いその割合は減少した。

Table 5-2. The effects of initial medium pH level on the formation of constitutive and inducible histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum*

pH	Crude extract			% activity of HDC		HDC recovery (%)
	Protein content (mg)	Total HDC (units*)	Specific activity (units/mg)	Constitutive enzyme (%)	Inducible enzyme (%)	
5.0	22.0	1.0	0.05	27	73	60
5.5	30.3	6.8	0.22	25	75	56
6.0	33.4	20.7	0.62	17	83	54
6.5	29.5	12.4	0.42	17	83	60
7.0	28.3	10.2	0.36	19	81	59
7.5	27.6	6.7	0.24	3	97	58
8.0	28.0	5.0	0.18	6	94	55

HDC, histidine decarboxylase.
* One unit is defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mole of histamine at 25 °C for 1 h.

異なる NaCl 濃度で培養した菌体からの抽出液に関しては (Table 5-3)、HDC の比活性は 5% NaCl での培養菌体で特に高く、1% および 3% NaCl 培養菌体がこれに続いた。また、構成的 HDC と誘導性 HDC の割合を見ると、培地の NaCl 濃度が上昇するにつれて誘導性 HDC の割合は急激に増加し、つまり誘導性 HDC の割合は 1% NaCl 培養菌体では 6%であったが、5% NaCl 培養菌体では 97%であった。また、海水の代わりに NaCl を用いた培地で培養した菌体からの抽出液では、ゲルろ過での HDC の回収率が著しく高かった。なお、3% NaCl 存在下で最も良い生育を示し、1%および 5% NaCl では若干生育は低下した。

Table 5-3. The effects of medium NaCl concentration on the formation of constitutive and inducible histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum*

NaCl (%)	Crude extract			% activity of HDC		HDC recovery (%)
	Protein content (mg)	Total HDC (units*)	Specific activity (units/mg)	Constitutive enzyme (%)	Inducible enzyme (%)	
1	16.9	7.1	0.42	94	6	84
3	25.5	8.2	0.32	40	60	89
5	20.3	22.1	1.09	3	97	86

HDC, histidine decarboxylase.
* One unit is defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mole of histamine at 25 °C for 1 h.

P. phosphoreum から調製した構成的 HDC と誘導性 HDC の活性に及ぼす温度、pH および NaCl 濃度の影響

P. phosphoreum から調製した構成的 HDC と誘導性 HDC の活性に及ぼす温度、pH および NaCl 濃度の影響を調べた結果を、それぞれ Fig. 5-3、5-4 および 5-5 に示す。

Fig. 5-3 に示すように、誘導性 HDC と構成的 HDC の至適温度は各々 30°C と 40°C であった。また、構成的 HDC は誘導性 HDC に比べより高温で、誘導性 HDC は構成的 HDC に比べより低温で作用し、特に誘導性 HDC は 0°C でも最大値の 25% の活性を示した。

Fig. 5-4 に示すように、構成的 HDC および誘導性 HDC の至適 pH は各々 6.0 と 6.5 であった。また、pH 5.0 では誘導性 HDC が全く活性を示さなかったが、構成的 HDC は最大値の約 40% の活性を示し、逆に pH 8.0 では構成的 HDC は全く活性を示さなかったが、誘導性 HDC は最大値の 50% 程度の活性を示した。

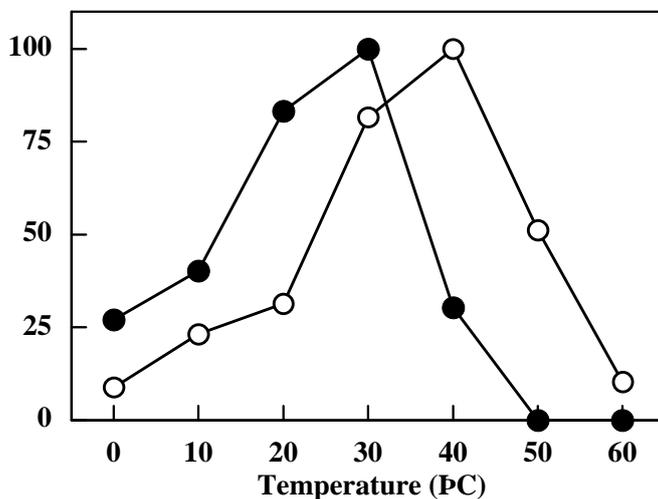


Fig. 5-3. The effects of reaction temperatures on the activity of constitutive and inducible histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum*.

○, constitutive histidine decarboxylase; ●, inducible histidine decarboxylase.

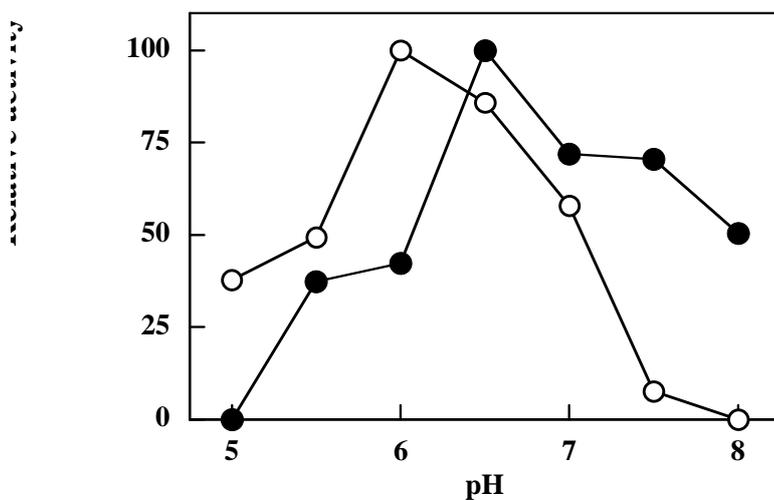


Fig. 5-4. The effects of reaction pH levels on the activity of constitutive and inducible histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum*. ○, constitutive histidine decarboxylase; ●, inducible histidine decarboxylase.

Fig. 5-5 に示すように、構成的 HDC および誘導性 HDC とも NaCl が存在しない状態で活性は最も高く、NaCl 濃度の増加に伴いそれらの活性は低下した。

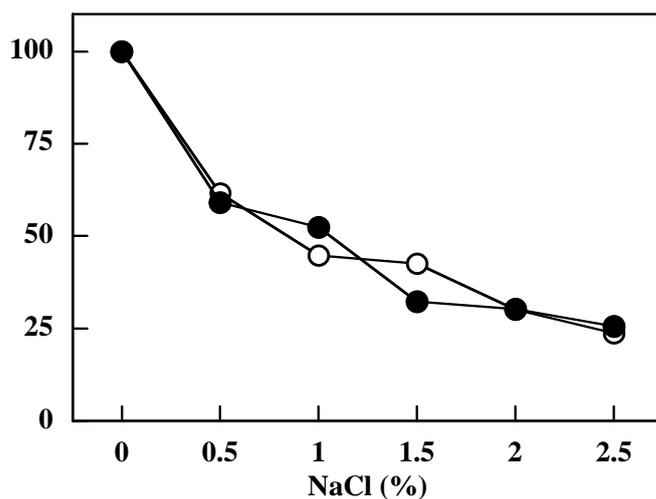


Fig. 5-5. The effects of reaction NaCl concentrations on the activity of constitutive and inducible histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum*. ○, constitutive histidine decarboxylase; ●, inducible histidine decarboxylase.

考 察

*M. morgani*などの既報のヒスタミン生成菌の HDC は誘導性と考えられている^{26、27)}。今回供試した *M. morgani* も誘導性の HDC を産生した。*M. morgani*などのヒスタミン生成菌が構成的な HDC を産生しないという報告は見当たらないが、今回供試した *M. morgani* はそれを産生しなかった。しかしながら今回、*P. phosphoreum* は構成的な HDC を産生し、その特異性が示唆された。

今回、*P. phosphoreum* は 15°C～25°C 付近で生育は良く、それ以下では生育は抑制された。しかしながら、*P. phosphoreum* からの菌体抽出液の HDC 活性は、7°C 培養菌体は 15°C～25°C 培養菌体に比べ極めて高い値を示した。このような結果は他の菌についても知られている。例えば、Gale²⁵⁾ は *E. coli* 菌体の HDC 活性は 37°C 培養より 27°C 培養の方が高いことを報告している。

また、*M. morgani*^{8、20、32、33)} および *Photobacterium* 株⁹⁾ の洗浄菌体の HDC 活性は各々 20～25°C および 15～20°C 培養菌体で最大値を得ている。また今回、*P. phosphoreum* の 7 °C 培養菌体は他の温度での培養菌体に比べ、誘導性 HDC を最も高い割合で産生した。これらの結果は、7°C 培養で誘導性 HDC の産生が促進されることを示唆する。この示唆は、低温貯蔵魚のヒスタミン生成に関連し、極めて重要である。

Allin¹⁸⁾ は、酸性培地が *Escherichia coli* と *Salmonella* の HDC 産生を促進するとした。Ienistea²⁹⁾ は洗浄菌体を用いた実験で、多くの細菌の HDC 産生のための至適 pH は 5.0～5.5 であるとした。また、栗原ら⁹⁾ によると *Photobacterium* の HDC 活性が pH 4.5 で最大であったとしている。しかしながら、供試 *P. phosphoreum* からの菌体抽出液の HDC 活性は、pH 6.0 で培養した菌体で最大となり、サバ科魚類の魚肉の pH 範囲が 5.5～6.5 である^{11、12、13)} ことを考えると、食品衛生学的見地からは注意を要する。ところで今回、培地の pH が上昇するにつれて、それらの菌体中の誘導性 HDC の割合が高くなり、このこと

は誘導性 HDC が pH 8.0 でも高い活性を維持することと関連があると思われる。

供試 *P. phosphoreum* からの菌体抽出液の HDC 活性は、NaCl 濃度が高くなるにつれて誘導性 HDC の割合が高くなったことから、NaCl 濃度の上昇が *P. phosphoreum* の HDC の産生を促進することを示唆する。ところで、海水の代わりに NaCl を用いた培地で培養した菌体からの抽出液では、ゲルろ過での HDC の回収率が著しく高かったが、これは用いた培地で代謝産物が異なったためと考える。

ヒスタミン生成反応の至適温度は、洗浄菌体を用いた実験では中温細菌で 37°C²⁰⁾ や 40°C²⁵⁾ など、低温細菌の *P. phosphoreum* では 35~40°C⁴⁾ が報告されている。これらと比べ、今回の誘導性 HDC の反応至適温度は 30°C で、これまでの報告と比べるとやや低いようである。特に誘導性 HDC が 0°C で最大値の 25% の活性を示したことは特徴的である。ところで第 3 章で、*P. phosphoreum* の菌体抽出液のヒスタミン生成反応の至適温度は 40°C と報告したが、同実験はジチオトレイトール (DTT) 無添加で行っている。DTT 無添加では誘導性 HDC は分解されること、また今回の実験で構成的 HDC の至適温度は 40°C であったことから、第 3 章で述べた菌体抽出液のヒスタミン生成反応の至適温度 40°C は構成的 HDC の活性を反映しているといえる。

ヒスタミンの生成反応の至適 pH は低温好塩性菌で pH 5.4⁴⁾、中温性細菌の *Proteus morgani*^{7, 20)} や *Proteus vulgaris*²⁰⁾ で pH 6.0~6.5 と報告されている。一方、中温細菌はアルカリ側で HDC 活性は急減しているが、低温好塩菌はアルカリ側での HDC 活性の低下が緩慢である。供試 *P. phosphoreum* の構成的 HDC の至適 pH は 6.0 で、誘導性 HDC のそれは 6.5 であり、既報の菌株とほぼ同様であった。また、供試菌の誘導性 HDC は低温好塩菌と同様にアルカリ域でもその活性が高かった。なお、中温性細菌は陸生細菌で、低温好塩性細菌と供試菌は海洋性細菌である。ところで第 3 章で、*P. phosphoreum* の菌体抽出液のヒスタミン生成反応の至適 pH は 6.0 付近であったが、同実験は DTT 無添加で行っている。DTT 無添加では誘導性 HDC は分解されること、

また今回の実験で構成的 HDC の至適 pH は 6.0 であったことから、第 3 章で述べた菌体抽出液のヒスタミン生成反応の至適 pH 6.0 は構成的 HDC の活性を反映しているといえる。

ヒスタミン生成細菌に関する研究の多くは陸棲細菌に関して行われており、したがってヒスタミン生成に及ぼす NaCl の影響に関して調べた研究はほとんど見られない。奥積ら⁴⁾は低温好塩性ヒスタミン生成細菌の洗浄菌体を用いた実験で、ヒスタミン生成には NaCl の濃度の影響はほとんど無いとしている。ところが今回、供試 *P. phosphoreum* の構成的および誘導性 HDC とも NaCl の存在しない状態で最も高く、NaCl 濃度の増加に伴いそれらの活性は低下した。また第 3 章では、*P. phosphoreum* の菌体のヒスタミン生成活性は 2~4% NaCl 存在下で極めて高く 0、1 および 5% NaCl では急減すること、また菌体抽出液では NaCl 無添加で最も高く NaCl 濃度の増加に伴いその活性が低下することを報告し、いずれの結果も奥積らの結果と異なった。

要 約

異なる温度、pH および NaCl 濃度で培養した *P. phosphoreum* からの菌体抽出液を用い、HDC の産生および活性に及ぼす温度、pH および NaCl 濃度の影響を調べると共に、この影響に構成的および誘導性 HDC がどのように関わっているかを調べた。供試菌の HDC 産生能は、培養の温度は 7°C、pH は 6.0 および NaCl 濃度は 5% で最大となったが、生育は 7°C および 5% NaCl 培養で抑制され、pH 6.0 では最も良い生育を示した。また、誘導性 HDC および構成的 HDC に占める誘導性 HDC の割合は 7°C、pH 7.5 および 5% NaCl 培養菌体で最も高く、HDC 産生能の上昇には誘導性 HDC の関与が示唆された。誘導性 HDC 活性は 30°C および pH 6.5 で、構成的 HDC 活性は 40°C および pH 6.0 で最大となり、また両酵素で作用する温度および pH の範囲が異なった。これは本菌によるヒスタミン生成がより広い環境条件下で起こり得ることを意味する。また、両酵素活性とも NaCl 無添加で最大となり、NaCl 濃度の増加に伴いそ

これらの活性は低下した。

第2節 *Photobacterium phosphoreum* のヒスチジン脱炭酸酵素産生に

及ぼす海水の影響

緒 言

ヒスタミン生成に関する研究の多くは陸生のヒスタミン生成細菌に関するものであり、したがってヒスタミン生成に及ぼす塩分の影響に関する報告も数少ない。既報の研究は、海洋性の *Photobacterium phosphoreum* に関して行われているが⁴⁾、その研究は NaCl 濃度の影響に関するものである。また第 5 章・第 1 節でもこれと同様な実験結果を示したが、ヒスタミン生成に及ぼす海水濃度の影響の影響は不明である。そこで、本研究では *P. phosphoreum* のヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 産生に及ぼす海水濃度の影響を調べた。加えて、海水中の塩類が HDC 産生に及ぼす影響についても検討した。

材料と方法

細菌、培地および生育条件

供試菌として、氷冷したサバから分離した *P. phosphoreum* NUFM 262 株を用いた。培養には通常 SWYP 培地を用い、培養温度は特記しない限り 25°C とした。ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 産生に及ぼす海水濃度の影響を調べる実験では、ヒスチジン濃度を 1% とした Moeller の培地を用いたが、Moeller 培地で用いる蒸留水の代わりに 12.5、25、50、75 および 100% 海水培地を用いて実験した。なお、12.5% 海水で調製した Moeller の培地は、培養齢の違いが HDC 産生に及ぼす影響を調べた実験でも用いた。一方、海水中の主要塩類が HDC 産生に及ぼす影響に関する実験では、L-ヒスチジン添加 SWYP 培地 [0.5% バクトペプトン (Difco)、0.2% 酵母エキス粉末 (Oxoid) および 0.3% L-ヒスチジン (和光) を 75% 熟成ろ過海水に溶解 (pH 6.2)] を用いたが、SWYP 培地で用いる 75% 海水の代わりに 3、5 および 6% NaCl 液、3% NaCl + 0.1M CaCl₂ 液、3% NaCl + 0.1M MgCl₂ 液並びに全海水を用いて試験した。

生育量の測定

生育量は 600 nm の吸光度で示した。

菌体抽出液の調製

供試菌の培養は 500 ml 容三角フラスコに入れた 200 ml の液体培地を用い、通常 *P. phosphoreum* からの菌体抽出液の調製には 1 回 800 ml の培養液を用いた。菌体抽出液の調製は、液体培養した菌体を遠心分離 (13,000×g で 15 分) し、少量の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) に懸濁した。細胞は氷冷しながら超音波破碎 (トミー精工株式会社のモデル UR-200P を用い、出力 5 で破碎) した。細胞断片を遠心分離 (17,000×g で 30 分) して除き、その上清液を菌体抽出液とした。

ゲルろ過および構成的 HDC と誘導性 HDC 画分の調製

菌体抽出液の 7 ml を 5 mM の DTT を含む 0.02 M に酢酸緩衝液 (pH 6.2) で平衡化した Sepharose CL-6B カラム (96×2.6 cm) に充填し、同緩衝液で展開した。流速 31.6 ml/時間で展開し、溶出液の 7.8 ml を分画した。

HDC 活性の測定

酵素液 0.3 ml、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) 0.5 ml および 50 mM ジチオトレイトール (DTT) 0.1 ml の混合液に 0.1 ml の L-ヒスチジン溶液 (10 mg/ml) を添加し混合し、25°C で反応させた後、沸騰水中に 5 分間漬けて反応を停止した。空試験は L-ヒスチジン添加前に酵素を加熱失活させて行った。生じたヒスタミンは Taylor の方法^{5,9)} で測定した。酵素 1 単位は 25°C で 1 時間に 1 μmole のヒスタミンを生成する酵素量とした。

結 果

生育に及ぼす海水濃度の影響

異なる海水濃度で培養した *P. phosphoreum* の培養 12 時間後の生育量を Fig. 5-6 に示す。生育量は 75～50% 海水培地で最も高く、100% および 25% 海水培地で最大生育量の 75% 程度で、12.5% 海水培地では最大生育量の 20% 以下であった。

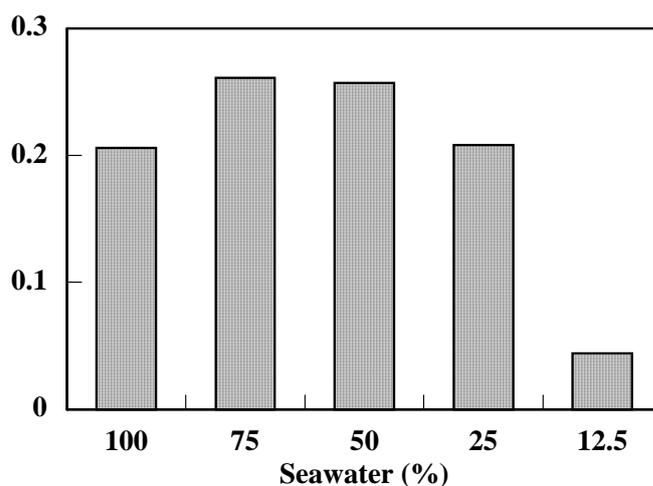


Fig. 5-6. Growth of *Photobacterium phosphoreum* incubated in 1% L-histidine-containing Moeller's media with 12.5, 25, 50, 75, and 100% seawater at 25°C for 12 h .

構成的 HDC および誘導性 HDC の産生に及ぼす海水濃度の影響

異なる海水濃度の培地で培養した *P. phosphoreum* の菌体抽出液のゲルろ過の結果を Fig. 5-7 に示す。25% 海水で培養した菌体では構成的 HDC (ピーク I) と誘導性 HDC (ピーク II) の生成割合はほぼ等しかったが、12.5% 海水培養菌体では構成的 HDC の割合が著しく高くなり、反対に 50% 海水以上で培養した菌体では HDC の大半が誘導性 HDC で占められた。なお、HDC の生成量は 12.5% および 50% 海水培養菌体では極めて低く、50% 海水培養菌体、さらに 100% 海水培養菌体と海水濃度を高くなるにつれて、その生成量は急激に増加した。

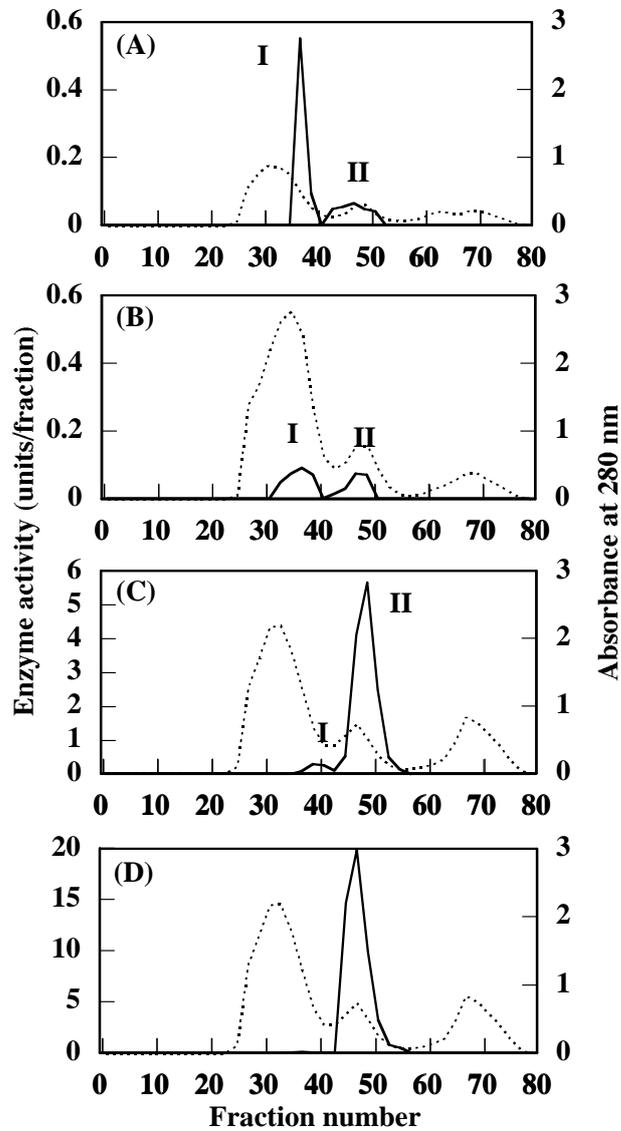


Fig. 5-7. Sepharose CL-6B gel filtration patterns of the crude extracts of *Photobacterium phosphoreum* grown in 1% L-histidine-containing Moeller's media with 12.5 (A), 25 (B), 50 (C), and 100% (D) seawater at 25°C for 12 h

—, enzyme activity ; ···, absorbance at 280nm.

HDC の産生に及ぼす各種塩濃度の影響

種類の異なる塩で塩濃度を変えた培地を用い培養した菌体の抽出液

の HDC 活性を Fig. 5-8 に示す。菌体抽出液中の HDC 活性は、塩の種類に関わらず、培地中の総塩濃度が高くなるにつれて、高くなる傾向が見られた。

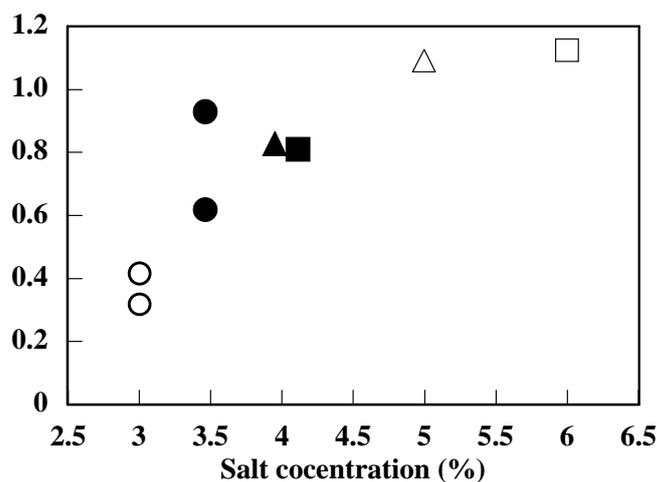


Fig. 5-8. Histamine formation by *Photobacterium phosphoreum* grown in SWYP broth containing different concentrations of salt at 20°C for 24 h. ○, 3% NaCl solution; △, 5% NaCl solution; □, 6% NaCl solution; ●, seawater; ▲, 3% NaCl solution containing 0.1M CaCl₂; ■, 3% NaCl solution containing 0.1M MgCl₂.

12.5% 海水培養菌体における構成的および誘導性 HDC の経時的変化

12.5% 海水で培養した培養齢の異なる *P. phosphoreum* の菌体抽出液のゲルろ過の結果を Fig. 5-9 に示す。本実験は特に興味があった構成的 HDC の割合が高かった菌体について実施した。12 時間培養（生育対数期）菌体では構成的 HDC の割合が高かったが、18 時間培養（定常期）菌体および 24 時間培養（死滅期）菌体では構成的 HDC と誘導性 HDC の割合はほぼ等しかった。なお、菌体抽出液中の全 HDC 活性は培養齢による違いをほとんど認めなかった。

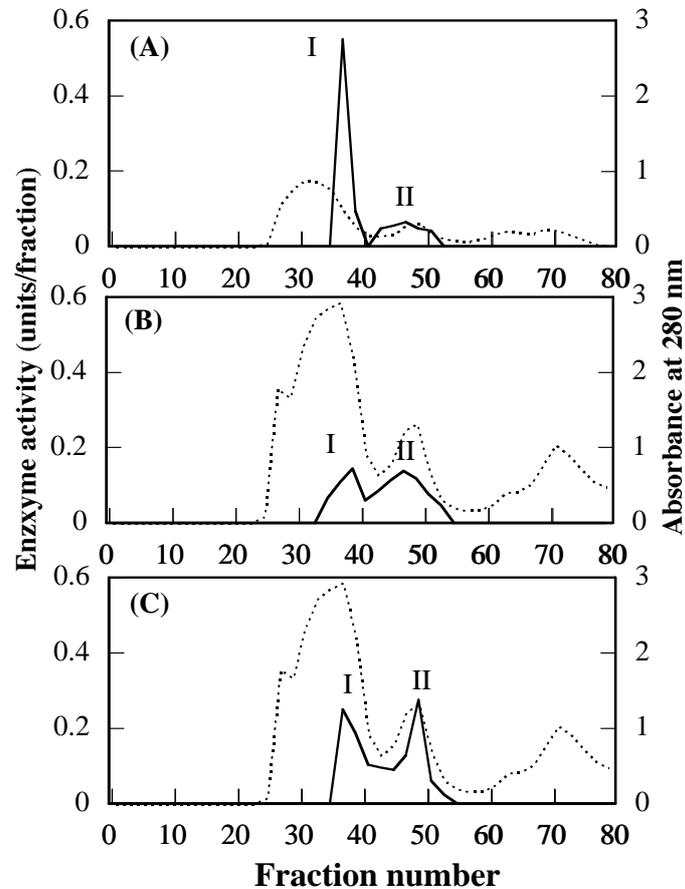


Fig. 5-9. Sepharose CL-6B gel filtration patterns of the crude extracts of *Photobacterium phosphoreum* grown in 1% L-histidine-containing Moellaer's medium with 12.5% seawater at 25°C for 12 (A), 18 (B), and 24 h (C).

—, enzyme activity; ···, absorbance at 280 nm.

考 察

P. phosphoreum の生育は 25% 海水から 100% 海水培地までほぼ良好であった。一方、HDC 産生能は 12.5% 海水および 25% 海水培地培養では低く、50%および 100% 海水培養と海水の濃度が高くなるにつれて誘導性 HDC の増加が見られ、つまり海水濃度の上昇に伴い誘導性 HDC の誘導が促進されることが示された。これは本章第 1 節で示した培地 NaCl 濃度の上昇に伴い誘導性 HDC の誘導が促進される傾向と同じであ

った。ところで、生育に NaCl を必要とする細菌は、物質の膜透過に NaCl を必要とすることが知られている^{40、52)}。また、海洋細菌の中には Ca イオンや Mg イオンなどの 2 価金属イオンを必要とするものも知られている^{28、41)}。*P. phosphoreum* では Ca イオンや Mg イオンの有無に関わらず塩濃度の上昇に伴い HDC 産生量は増加した。したがって *P. phosphoreum* のヒスタミン生成能は塩の種類に関わらず、総塩濃度が高くなるにつれて高くなると判断される。また、*P. phosphoreum* の HDC 産生の至適 NaCl 濃度は生育至適 NaCl 濃度より高かった。高度好塩菌ではあるが、グルタミン酸の取り込みに高濃度の NaCl を必要とする菌⁵⁵⁾ も知られており塩濃度とヒスチジンの取り込みとの関連性も興味深い。

ところで第 1 節では、低 NaCl 濃度の培地では構成的 HDC の割合が増加することを述べた。また今回も、12.5% 海水培地での 12 時間培養では誘導性 HDC より構成的 HDC の割合が高かった。したがって、12.5% 海水培地を用いて構成的および誘導性 HDC 産生の推移を調べたが、培養初期でのみ構成的 HDC の割合が高かった。構成的 HDC は培養初期の極一時期に産生され易いのかもしれない。

要 約

P. phosphoreum の HDC 産生に及ぼす海水濃度の影響を調べると共に、海水中の塩類が HDC 産生に及ぼす影響についても調べた。25% 海水で培養した菌体では構成的 HDC と誘導性 HDC の生成割合はほぼ等しかったが、12.5% 海水培養菌体では構成的 HDC の割合が著しく高くなり、反対に 50% 海水以上での培養した菌体では HDC の大半が誘導性 HDC で占められた。なお、菌体抽出液中の HDC 活性は 12.5% および 50% 海水培養菌体では極めて低く、50% 海水培養菌体、さらに 100% 海水培養菌体と海水濃度が高くなるにつれて、その活性も急激に高くなった。菌体抽出液中の HDC 活性は、塩の種類に関わらず、培地中の総塩濃度

が高くなるにつれて、高くなる傾向が見られた。低塩濃度下の生育対数期では構成的 HDC の割合が高かった菌体抽出液でも、定常期および死滅期では構成的 HDC と誘導性 HDC の割合はほぼ等しくなった。

第6章 *Photobacterium phosphoreum* のヒスチジン脱炭酸酵素 遺伝子の *Escherichia coli* での機能発現

緒 言

これまでに数多く研究されている *Morganella morganii* など腸内細菌科の中温性細菌のヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)は誘導性 HDC である。しかしながら、今研究で使用している低温好塩性の *Photobacterium phosphoreum* の HDC は構成的 HDC と誘導性 HDC から成り、それらの反応至適条件が異なった。また、共同研究者により供試菌の1つのヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子 (*hdc*) のクローニング、塩基配列の決定、および大腸菌への形質転換が行われた。それ故、*P. phosphoreum* の HDC 遺伝子は構成的 HDC と誘導性 HDC のどちらの遺伝子であるのか、また *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子が産生する HDC はどのような機能をもつのか、特にその反応温度に関してはどうであるかなどに興味をもった。そこで *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子を導入した *Escherichia coli* を用い、*P. phosphoreum* の HDC 遺伝子が産生する HDC の機能を調べた。加えて、低温性 *P. phosphoreum* の HDC が *M. morganii* などのような中温性ヒスタミン生成菌の HDC と進化的にどのような違いがあるのかを分子系統樹を用いて調べた。

材料と方法

供試菌および培地

供試菌 *P. phosphoreum* PP0101 は 2001 年に長崎の鮮魚店で入手したマサバ *Scomber japonicus* から分離したヒスタミン生成菌で、16S rRNA の塩基配列、形態、生化学性状および生理学的性状により同定した。また、本実験には受容菌 *E. coli* BL21(DE3) (Novagen)、ベクタープラスミド pET-11a (Novagen) を導入した受容菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-11a および *P. phosphoreum* HDC 遺伝子 (*hdc*) を組み

込んだベクタープラスミド pET-11ahdc を導入した受容菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-11ahdc の3つの大腸菌を用いた。なお、これら組換え実験と形質転換実験は共同研究者により行われた。

E. coli BL21(DE3)およびその形質変換体によるヒスタミン生成実験には Moeller の培地 [0.5% バクトペプトン (Difco)、0.5% バクト酵母エキス (Difco)、0.05% グルコースおよび 1% L-ヒスチジンを含む (pH 6.0)] を用いた。菌体抽出液を得るための *E. coli* の培養には Lurina-Bertani (LB) ブロス [1% バクトトリプトン (Difco)、0.5% バクト酵母エキス (Difco) および 1% NaCl を含む (pH 7.5)] を用いて 37°C で、また *P. phosphoreum* の培養には SWYP 培地 [0.5% バクトペプトン (Difco) および 0.3% バクト酵母エキス (Difco) を 75% 熟成ろ過海水に溶解 (pH 6.2)] を用い 25°C で培養した。なお、L-ヒスチジンは必要に応じて 0.2% を添加した。

***P. phosphoreum* の HDC 遺伝子の発現試験**

受容菌に導入した *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子の発現を確認するため、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* BL21(DE3)/pET-11a および *E. coli* BL21(DE3)/pET-11ahdc の3つの大腸菌を 37°C で培養し、生成されるヒスタミン量を経時的に調べた。ヒスタミン量の定量は Taylor らの方法^{5,9)} に従った。なお、生育量は 600 nm の吸光度で示した。

***P. phosphoreum* の HDC 遺伝子の発現産物の性状測定試験**

受容菌に導入した *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子の発現産物 (HDC) が構成的 HDC か誘導性 HDC かを調べるため、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* BL21(DE3)/pET-11a および *E. coli* BL21(DE3)/pET-11ahdc の3つの大腸菌を用い、ヒスチジン添加培地で培養した菌体の抽出液を Sepharose CL-6B ゲルろ過による分析に供した。また、*E. coli* BL21(DE3)/pET-11ahdc 株は、ヒスチジン無添加培地で培養した菌体の抽出液もゲルろ過した。他方、分画した HDC の活性に及ぼす温度、pH および NaCl 濃度の影響を測定した。なお、比較のため *P. phosphoreum*

のヒスチジン添加および無添加培養した菌体からの抽出液もゲルろ過した。

菌体抽出液の調製

供試菌の培養は 500 ml 容三角フラスコに入れた 200 ml の液体培地を用い、通常 *P. phosphoreum* からの菌体抽出液の調製には 1 回 800 ml の培養液を用いた。菌体抽出液の調製は液体培養した菌体を遠心分離 (13,000 × g で 15 分) し、少量の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) に懸濁した。細胞は氷冷しながら超音波破碎 (トミー精工株式会社 of モデル UR-200P を用い、出力 5 で破碎) した。細胞断片を遠心分離 (17,000 × g で 30 分) して除き、その上清液を菌体抽出液とした。

ゲルろ過および構成的 HDC 画分と誘導性 HDC 画分の調製

菌体抽出液の 7 ml を 5 mM のジチオトレイトール (DTT) を含む 0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) で平衡化した Sepharose CL-6B カラム (96 × 2.6 cm) に充填し、同緩衝液で展開した。流速 31.6 ml/時間で展開し、溶出液の 7.8 ml を分画した。

HDC 活性の測定

酵素液 0.3 ml、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.2) 0.5 ml および 50 mM DTT 0.1 ml の混合液に 0.1 ml の L-ヒスチジン溶液 (10 mg/ml) を添加混合し、25°C で 1 時間反応させた後、沸騰水中に 5 分間漬けて反応を停止した。対照試験は L-ヒスチジン添加前に酵素を加熱失活させて行った。生じたヒスタミンは Taylor の方法^{5,9)} で測定した。酵素 1 単位は 25°C で 1 時間に 1 μmole のヒスタミンを生成する酵素量とした。

温度、pH および NaCl 濃度に関する HDC 活性の測定

ゲルろ過で分離した構成的 HDC 画分と誘導性 HDC 画分とを用いた。各酵素は 10°C 間隔で 0–60°C まで、pH 1 間隔で 5.0–8.0 まで、NaCl は 0.5% 間隔で 0–2.5% まで測定した。各 pH における反応には

McIlvaine 緩衝液 (0.1 M クエン酸 / 0.2 M リン酸水素二ナトリウム) を用いた。

分子系統樹の作成方法

分子系統樹の作成のために、供試 *P. phosphoreum* およびこれまでに知られているグラム陰性のヒスタミン生成菌 (*Enterobacter aerogenes*、*Listonella anguillarum*、*M. morgani*、*Pseudomonas fluorescens* および *Raoultella planticola*) を用いた。分子系統樹の作成は PAUP* [Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other methods), version 4.0b10, D. L. Swofford, Sinauer, Sunderland, Mass] を用いた。分子系統樹は近隣結合法と最大節約法を用い、HDC アミノ酸配列から作成した。各結節の信頼性が 1000 ブートストラップ系統樹で評価された。

結 果

E. coli での *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子の発現

E. coli BL21(DE3)、*E. coli* BL21(DE3)/pET-11a および *E. coli* BL21(DE3)/pET-11ahdc 株の生育に伴うヒスタミンの生成を Fig. 6-1 に示す。供試したいずれの大腸菌ともほぼ同じ生育曲線を示したが、ヒスタミン生成能は *E. coli* BL21(DE3)/pET-11ahdc 株は *E. coli* BL21(DE3) および *E. coli* BL21(DE3)/pET-11a 株よりも高く、また後 2 者ではほとんど違いが見られなかった。つまり、受容菌 *E. coli* BL21(DE3) に導入した *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子が発現した。

E. coli で発現した *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子産物

E. coli BL21(DE3) のヒスチジン添加培養菌体、*E. coli* BL21(DE3)/pET-11ahdc のヒスチジン添加および無添加培養菌体、および *P. phosphoreum* のヒスチジン添加および無添加培養菌体の抽出液のゲルろ過の結果を各々 Fig. 6-2~6-6 に示す。

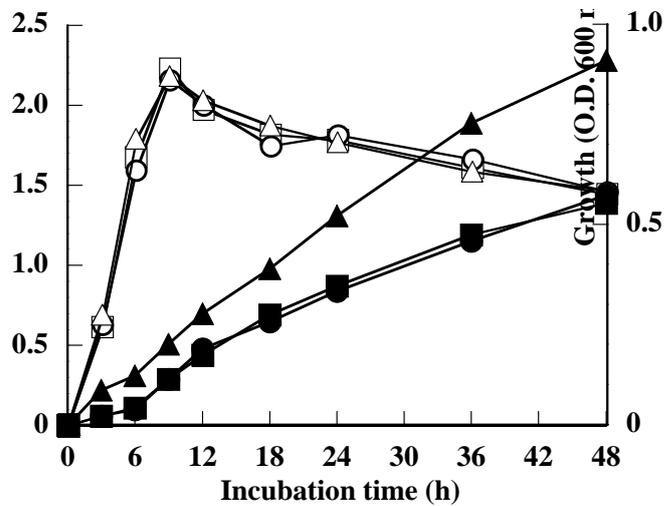


Fig. 6-1. Expression of the recombinant histidine decarboxylase in *Escherichia coli* BL21(DE3) grown at 37°C in Moeller's decarboxylase basal medium. Growth (□) and histamine formation (■) in *E. coli* BL21(DE3) that was used as a host for expression of the *hdc* gene from *Photobacterium phosphoreum*; growth (○) and histamine formation (●) in *E. coli* BL21(DE3) containing the empty pET-11a; growth (△) and histamine formation (▲) in *E. coli* BL21(DE3) harboring the recombinant pET-11a.

E. coli BL21(DE3)株のヒスチジン添加培養菌体抽出液 (Fig. 6-2) では HDC 活性ピーク I (分画番号 35-45) だけを認めた。この結果は *E. coli* BL21(DE3)/pET-11a 株でも同様であった。つまり、受容菌として用いた *E. coli* にはピーク I の HDC 産生能があった。

E. coli BL21(DE3)/pET-11a*hdc* 株のヒスチジン添加 (Fig. 6-3) および無添加培養菌体抽出液 (Fig. 6-4) では、いずれも HDC 活性ピーク I (分画番号 35-43) とピーク II (分画番号 43-53) の 2 つの HDC が確認され、またピーク II 画分はピーク I 画分より極めて高い活性を示した。

P. phosphoreum のヒスチジン添加培養菌体抽出液 (Fig. 6-5) では HDC 活性ピーク I (分画番号 35-43) とピーク II (分画番号 43-53)

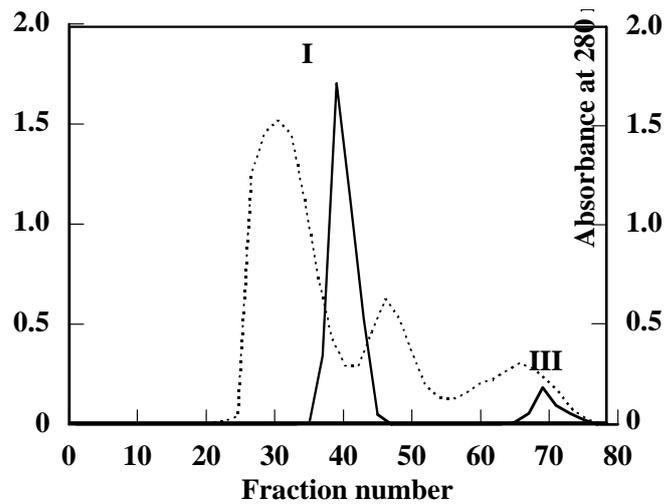


Fig. 6-2. Sepharose CL-6B gel filtration of the histidine decarboxylase in crude extract from the control *Escherichia coli* (*E. coli* BL21(DE3) harboring the empty pET-11a) grown in LB broth containing 0.2% L-histidine at 37°C for 24 h under aerobic stationary condition. —, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm.

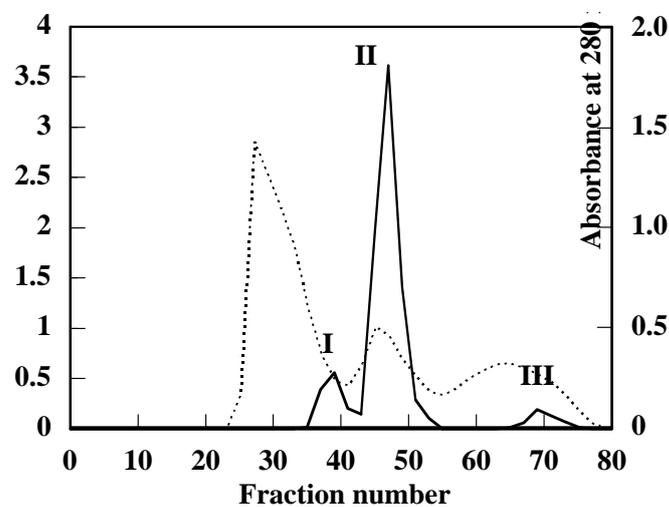


Fig. 6-3. Sepharose CL-6B gel filtration of the histidine decarboxylase in crude extract from the recombinant *Escherichia coli* (*E. coli* BL21(DE3) harboring the recombinant pET-11a) grown in LB broth containing 0.2% L-histidine at 37°C for 24 h under aerobic stationary condition. —, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm.

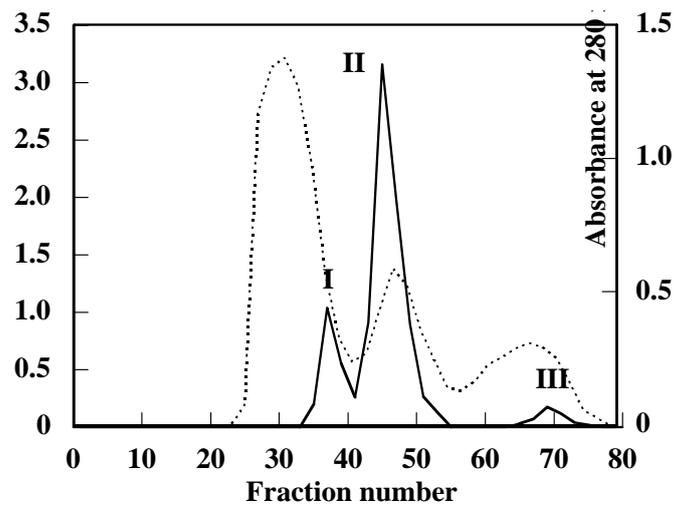


Fig. 6-4. Sepharose CL-6B gel filtration of the histidine decarboxylase in crude extract from the recombinant *Escherichia coli* (*E. coli* BL21(DE3) harboring the recombinant pET-11a) grown in LB broth (the absence of L-histidine) at 37°C for 24 h under aerobic stationary condition.

—, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm.

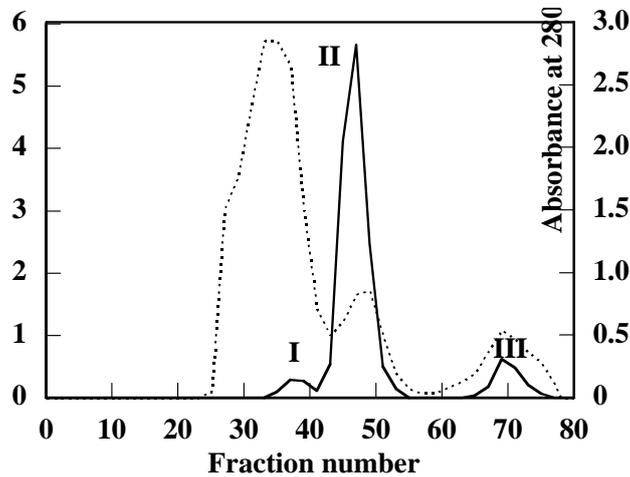


Fig. 6-5. Sepharose CL-6B gel filtration of the histidine decarboxylase in crude extract from *Photobacterium phosphoreum* grown in SWYP medium containing 0.2% L-histidine at 25°C for 24 h under aerobic stationary condition.

—, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm.

の2つのHDCが確認され、また後者は前者より極めて高い活性を示した。一方、同無添加培養菌体抽出液 (Fig. 6-6) では活性ピーク I (分画番号 35-43) しか確認できなかった。

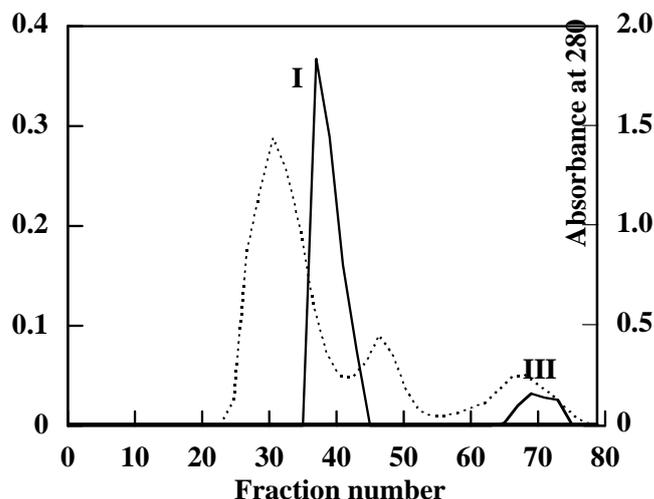


Fig. 6-6. Sepharose CL-6B gel filtration of the histidine decarboxylase in crude extract from *Photobacterium phosphoreum* grown in SWYP medium (the absence of L-histidine) at 25°C for 24 h under aerobic stationary condition.

—, histidine decarboxylase activity; ···, absorbance at 280 nm.

E. coli で発現した *P. phosphoreum* HDC 遺伝子産物の性状

E. coli BL21(DE3)/pET-11ahdc 株のヒスチジン添加培養菌体抽出液のゲルろ過で得られた活性ピーク I 画分とピーク II 画分の反応温度、pH および NaCl 濃度に及ぼす影響を調べた結果を各々 Fig. 6-7-6-9 に示す。

Fig. 6-7 に示すように、受容菌 *E. coli* BL21(DE3) 由来のピーク I 画分および *P. phosphoreum* 由来のピーク II 画分の反応至適温度は各々 40°C および 30°C で、これらの至適温度以上および以下の温度では活性は急激に低下した。

Fig. 6-8 に示すように、受容菌 *E. coli* BL21(DE3) 由来のピーク I 画分および *P. phosphoreum* 由来のピーク II 画分の反応至適 pH は各々

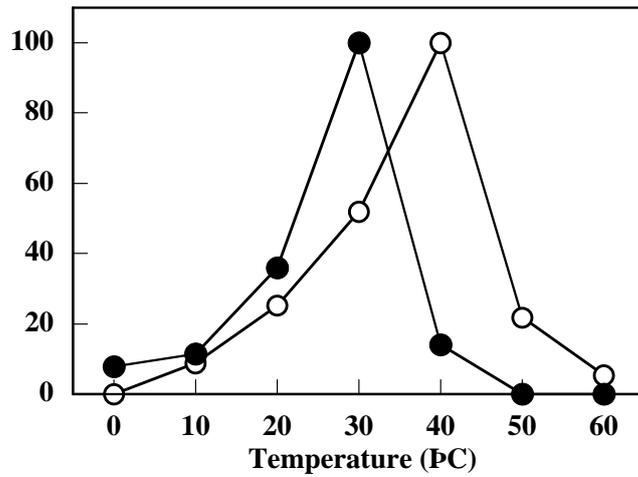


Fig. 6-7. The effects of reaction temperatures on the native (peak I found in Sepharose CL-6B gel filtration) and the recombinant histidine decarboxylase activities (peak II found in Sepharose CL-6B gel filtration) in the recombinant *Escherichia coli* (*E. coli* BL21(DE3) harboring the recombinant pET-11a).

○, native histidine decarboxylase; ●, recombinant histidine decarboxylase.

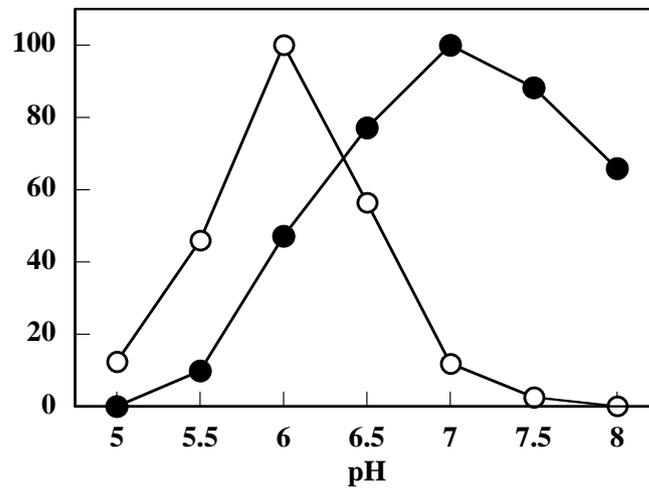


Fig. 6-8. The effects of reaction pHs on the native (peak I found in Sepharose CL-6B gel filtration) and the recombinant histidine decarboxylase activities (peak II found in Sepharose CL-6B gel filtration) in the recombinant *Escherichia coli* (*E. coli* BL21(DE3) harboring the recombinant pET-11a).

○, native histidine decarboxylase; ●, recombinant histidine decarboxylase.

pH6 および 7 で、これらの至適 pH 以上および以下の pH では活性は急激に低下した。

Fig. 6-9 に示すように、受容菌 *E. coli* BL21(DE3) 由来のピーク I 画分および *P. phosphoreum* 由来のピーク II 画分の反応至適 NaCl 濃度はいずれも 0% NaCl で、塩濃度が増加するにつれて活性は除々に低下した。

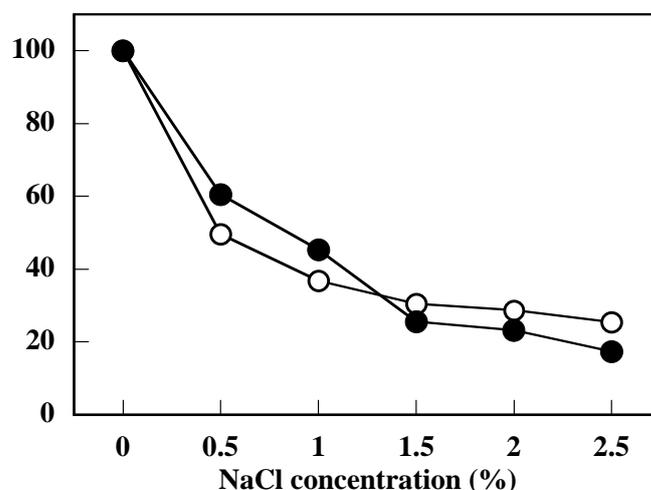


Fig. 6-9. The effects of reaction NaCl concentrations on the native (peak I found in Sepharose CL-6B gel filtration) and the recombinant histidine decarboxylase activities (peak II found in Sepharose CL-6B gel filtration) in the recombinant *Escherichia coli* (*E. coli* BL21(DE3) harboring the recombinant pET-11a).

○, native histidine decarboxylase; ●, recombinant histidine decarboxylase.

P. phosphoreum HDC 遺伝子の系統発生的位置

グラム陰性ヒスタミン生成菌の HDC アミノ酸配列に基づいて、近隣結合法と最大節約法で作成した分子系統樹を Fig. 6-10 に示す。グラム陰性ヒスタミン生成菌の HDC アミノ酸配列に基づいて、近隣結合法と最大節約法で作成した分子系統樹の中で、供試 *P. phosphoreum* と腸内細菌科の細菌 (*E. aerogenes*, *M. morgani* および *R. planticola*) は極めて高いブートストラップ値 (近隣結合法と最大節約法での分析で各々 99% と 75%) で系統発生的クレードを形成した。なお、これら細

菌間のアミノ酸配列の相同性は 84～80%であった。一方、供試 *P. phosphoreum* のアミノ酸配列と *L. anguillarum* および *P. fluorescens* のアミノ酸配列とは分岐した系統樹を形成し、またこれら細菌間のアミノ酸配列の相同性も低かった。しかしながら、供試 *P. phosphoreum* と *P. fluorescens* の 16S rRNA は系統発生的に近縁である。

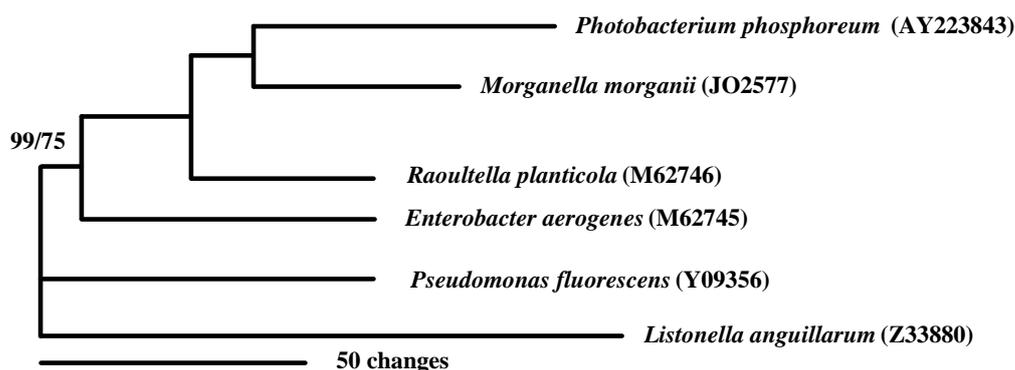


Fig. 6-10. Phylogenetic tree of gram-negative histidine decarboxylase-producing bacteria based on maximum-parsimony analysis (heuristic search) of histidine decarboxylase amino acid sequence. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentages) from 1,000 replicate based on neighbor-joining/maximum-parsimony analyses conducted using PAUP* version 4.0b10. Only nodes supported by 50% or greater are shown. GenBank accession numbers are given in parentheses following bacterial species.

考 察

E. coli BL21(DE3)/pET-11ahdc 株のヒスチジン添加培養菌体抽出液では、HDC 活性ピーク I とピーク II の 2 つの HDC を確認したが、*E. coli* BL21(DE3) 株および *E. coli* BL21(DE3)/pET-11a 株のヒスチジン添加培養菌体抽出液では HDC 活性ピーク I しか認めなかった。これらの結果から、*E. coli* BL21(DE3)/pET-11ahdc 株で認めたピーク I 画分の HDC は受容菌由来であること、ピーク II 画分の HDC は *P. phosphoreum* 由来の HDC と判断された。

他方、*P. phosphoreum* 株のヒスチジン添加培養菌体抽出液では HDC 活性ピーク I とピーク II の 2 つの HDC を確認したが、同無添加培養菌体抽出液では活性ピーク I しか確認できなかった。これらの結果から、ピーク I 画分は構成的 HDC、ピーク II 画分は誘導性 HDC と判断された。また、*E. coli* BL21 (DE3)/pET-11ahdc 株のヒスチジン無添加培養菌体抽出液でも HDC 活性ピーク I とピーク II の 2 つの HDC を確認した。しかもこれら両細菌の HDC 活性ピーク I とピーク II はゲルろ過での溶出位置が同じで、つまり同様な分子量であった。それ故、*E. coli* BL21 (DE3)/pET-11ahdc 株のヒスチジン無添加培養菌体抽出液の HDC 活性ピーク I は *E. coli* 由来の構成的 HDC と考えられ、ピーク II は *P. phosphoreum* 由来の誘導性 HDC と考えられた。この考えの正当性は、*E. coli* BL21 (DE3)/pET-11ahdc 株のピーク II 画分の性状（反応温度、pH および NaCl 濃度）が *P. phosphoreum* のピーク II 画分の性状とほぼ類似したことからも支持される。しかしながら、誘導性 HDC とするピーク I 画分が *E. coli* BL21 (DE3)/pET-11ahdc 株のヒスチジン無添加培養菌で認められたことについては、ベクタープラスミド（pET-11a）の調節配列が構成的発現だけをもつためと考えられた。

ところで、*M. organii* の HDC は誘導酵素であることを報告した^{4 6)}。その上今回、*P. phosphoreum* HDC のアミノ酸配列は *M. organii* を含む腸内細菌科の細菌の HDC アミノ酸配列と高い相同性を示した。加えて、*P. phosphoreum* とそれら腸内細菌科の細菌は、HDC のアミノ酸配列に基づく系統樹で、高いブートストラップ値での系統発生的クレードを形成した。それにも関わらず、低温下での HDC 産生の潜在能力は、低温性細菌である *P. phosphoreum* が中温性である腸内細菌科の細菌より高いであろう。実際今回、低温下での HDC 活性は、*P. phosphoreum* の HDC（形質転換体 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-11ahdc のカラムクロマトグラムのピーク II 画分）が *E. coli* のそれ（同ピーク I 画分）より高かった。これらの事実は *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子を *E. coli* に導入することで、広い温度範囲でヒスタミンの生成が起きることを示唆する。加えて、供試した受容菌 *E. coli* 本来の HDC と供試 *P. phosphoreum*

の構成的 HDC、また本受容菌の形質転換体で発現した HDC と供試 *P. phosphoreum* の誘導性 HDC に及ぼす反応温度、pH および NaCl 濃度が類似した。以上の結果から、*P. phosphoreum* は低温性細菌の HDC 活性に加えて中温性細菌の HDC 活性をもつこと、つまり鮮魚を含む水産食品の多様性からくる広範囲な環境で HDC の生成がなされることを示唆する。それ故、鮮魚の取扱いやその流通過程、調理の過程、および貯蔵に至る衛生的な取扱いがヒスタミン中毒を阻止するために必要である。

要 約

P. phosphoreum の HDC 遺伝子を導入した *E. coli* を用い、*P. phosphoreum* の HDC 遺伝子が産生する HDC の機能を調べた。加えて、低温性 *P. phosphoreum* の HDC が *M. morgani* などの中温性ヒスタミン生成菌の HDC と進化的にどのような違いがあるのかを分子系統樹を用いて調べた。形質転換実験の受容菌 *E. coli*BL21(DE3) は独自の HDC を産生した。*P. phosphoreum* の HDC 遺伝子を保持した *E. coli*BL21(DE3) は新たな HDC を産生し、これは *P. phosphoreum* の誘導性 HDC に相当した。加えて *E. coli*BL21(DE3) 本来の HDC は *P. phosphoreum* の構成的 HDC に相当した。また、*E. coli*BL21(DE3) 本来の HDC の反応至適温度、pH および NaCl 濃度は各々 40°C、6.0 および 0%、また同菌へ導入された HDC は 30°C、7.0 および 0% で、各々 *P. phosphoreum* の構成的 HDC と誘導性 HDC の至適条件と近似した。一方、HDC アミノ酸配列は *P. phosphoreum* と *M. morgani* を含む腸内細菌科の細菌との間で高いブートストラップ値で系統樹クレードを形成し、また高い相同性を示したが、分類学的に類似した *L. anguillarum* とは分岐した系統樹を形成し、また低い相同性を示した。

第 7 章 総 括

サバ科魚類など、いわゆる赤身魚の摂食によるアレルギー様食中毒が知られている。その主要な起因物質はヒスタミンであり、ヒスタミ

ン中毒とも呼ばれている。ヒスタミン生成細菌は多く報告されているが、低温貯蔵魚におけるヒスタミン生成はもっぱら *Photobacterium phosphoreum* に限られる。また、魚肉のヒスタミン含有量は輸入規制の目安になりつつある。よって、鮮魚の摂食によるヒスタミン中毒の阻止や鮮魚の商品価値を維持するためには *P. phosphoreum* のヒスタミン生成条件を知る必要がある。そこで、本研究では低温貯蔵魚でのヒスタミン生成とヒスタミン生成菌との関連性、低温貯蔵魚から分離した *P. phosphoreum* のヒスタミン生成能、すなわちヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 産生能および HDC 活性に及ぼす環境因子の影響、および *Escherichia coli* へ導入した *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子の発現に関する研究を行った。

第2章では低温貯蔵魚でのヒスタミン生成とヒスタミン生成菌との関連性を調べるために、氷蔵（氷と魚体が直接に接触する）および冷氷（氷と魚体が直接に接触しない）法を用いて貯蔵したサバにおける *P. phosphoreum* の消長とヒスタミン生成との関連性を調べた。その結果、氷蔵と氷冷のいずれも、表皮では *P. phosphoreum* の増殖はなく、筋肉外層でのヒスタミンの蓄積もほとんど認めなかった。一方、腹部内壁では両貯蔵下とも *P. phosphoreum* が増殖し、特に氷冷下では有意なヒスタミンの蓄積を認めた。なお本実験は2度行い、1度目の実験では上述の結果となったが、2度目の試料ではいずれの部位からも *P. phosphoreum* は検出されず、ヒスタミン量も微量に存在したに過ぎなかった。これらの結果から、ヒスタミン生成には *P. phosphoreum* が主体的に関与すること、またヒスタミン生成には貯蔵する鮮魚の状態および鮮魚が置かれている環境が密接に関わっていること示唆された。そこで

第3章では *P. phosphoreum* の洗浄菌体と菌体抽出液を用い、ヒスタミン生成に及ぼす物理的および化学的因子の影響を調べた。その結果、1) *P. phosphoreum* の生育至適温度は 25°C で、35°C 以上では生育しなかったが、ヒスタミンの生成至適温度は洗浄菌体で 35°C、菌体抽出液で 40°C であった。2) pH 5.5~8.0 では良好に生育し、pH 4.5 以下で

の生育は極度に抑制された。一方、ヒスタミン生成は洗浄菌体および菌体抽出液ともに pH 6.0 付近で最大となり、pH 8.0 ではその生成を認めなかった。3) NaCl 濃度は 2~4% で生育良好で、1 および 5% では著しく抑制され、0% では生育しなかった。洗浄菌体でのヒスタミン生成に及ぼす NaCl 濃度の影響は、生育での結果とほぼ同様の傾向を示したが、菌体抽出液では NaCl 無添加でその生成量は最大となり、NaCl 濃度の増加に伴いその量は漸減し、洗浄菌体の場合とは異なった。4) グルコース添加培養では培地の pH の低下と若干の生育抑制が見られたが、HDC 産生能はグルコース添加培養では無添加培養の約 2 倍高い活性を示した。5) HDC 産生能は嫌気培養では好気培養の約 2 倍高い活性を示した。ところで、酸素分圧がヒスタミン生成に及ぼす影響に関しては、これまでに相反する結果が報告されており、また菌体抽出液を凍結保存すると保存当初の HDC 活性は低下するが以降はほぼ一定となり、複数の HDC の存在を予測させた。そこで

第 4 章では異なる酸素分圧下で培養した *P. phosphoreum* の菌体抽出液をゲルろ過し、得られた HDC 画分の活性とその安定性を検討した。その結果、*P. phosphoreum* の生育はより好気状態で活発に生育したが、HDC 産生能はより嫌気状態で高かった。同菌は推定分子量 700,000 と 170,000 の 2 つ HDC を産生し、前者はヒスチジン添加および無添加培養に関係なく同程度の HDC を産生したことから構成的 HDC であること、また後者はヒスチジン無添加培養ではほぼ産生されなかったことから誘導性 HDC と判断された。また構成的 HDC は好気状態で、誘導性 HDC は嫌気状態で多く産生された。一方、誘導性 HDC は還元剤のジチオトレイトールで安定化されたが、構成的 HDC はむしろこの還元剤の存在で若干不安定であった。以上のように、*P. phosphoreum* は異なる酸素分圧下で培養すると培養した酸素分圧で HDC 産生能が異なったこと、また同菌には 2 つの HDC が存在し、培養酸素分圧でこの 2 つの HDC 産生能が異なったことから、第 5 章では酸素分圧以外の様々な物理的および化学的環境下で培養した *P. phosphoreum* の全 HDC 産生能および 2 つの HDC 産生能を調べた。

第5章・第1節では培養温度、pHおよびNaCl濃度が*P. phosphoreum*のHDCの産生に及ぼす影響を調べた。その結果、供試*P. phosphoreum*の培養の温度は7°C、pHは6.0およびNaCl濃度は5%でHDC産生能が最大となった。しかし、生育は7°Cおよび5%NaCl存在下で抑制され、pHは6.0では最も良い生育を示した。また、構成的HDCと誘導性HDCに占める誘導性HDCの割合は7°C培養および5%NaCl培養で最も高く、全HDC産生能の上昇には誘導性HDCの増加が深く関わっていた。pHについても同様の事が言えた。他方、構成的HDC活性は40°CおよびpH6.0、および誘導的HDC活性は30°CおよびpH6.5で最大となり、またこれら2つのHDCは反応する温度およびpHの上限および下限も異なった。これらの結果は*P. phosphoreum*によるヒスタミンの生成がより広い環境条件下で起こることを示唆した。また、両酵素ともNaCl無添加で活性は最大となり、NaCl濃度の増加に伴いそれは低下した。

第5章・第2節では*P. phosphoreum*のヒスタミン生成に及ぼす海水濃度の影響を調べると共に、海水中の主要塩類CaやMgイオンがヒスタミン生成に及ぼす影響も調べた。その結果、25%海水で培養した菌体では構成的HDCと誘導性HDCの生成割合はほぼ等しかったが、12.5%海水培養菌体では構成的HDCの割合が著しく高くなり（なお、生育対数期では構成的HDCの割合が高かった菌体でも、定常期および死滅期では構成的HDCと誘導性HDCの割合はほぼ等しくなった）、反対に50%海水以上での培養菌体ではHDCの大半が誘導性HDCで占められた。なお、HDCの生成量は12.5%および50%海水培養では極めて低く、50%海水培養、さらに100%海水培養と海水濃度が高くなるにつれてその生成量は急激に増加した。HDCの産生量は塩の種類に関わらず、生育範囲内では塩濃度が高くなるにつれてその量が増加する傾向が見られた。

ところで*Morganella morganii*などの腸内細菌科の中温性細菌のHDCは誘導性HDCただ1つである。しかしながら、低温好塩性の*P. phosphoreum*は構成的HDCと誘導性HDCから成った。その上、*P. phosphoreum*の誘導性HDCの反応温度は構成的HDCのそれに比べて低かった。それ故、*P. phosphoreum*のHDC遺伝子は構成的HDCと誘導

性 HDC のどちらの遺伝子であるのか、また *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子が産生する HDC はどのような機能をもつのか、特にその反応温度に関してはどうであるかなどに興味をもった。そこで

第 6 章では *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子が導入された *E. coli* (形質転換体) が産生する HDC の機能を調べた。加えて、低温性 *P. phosphoreum* の HDC が *M. morgani* などの中温性ヒスタミン生成菌の HDC と進化的にどのような違いがあるのかを分子系統樹を用いて調べた。その結果、形質転換実験の受容菌 *E. coli* BL21 (DE3) はそれ自体が HDC を産生し、これは *P. phosphoreum* の構成的 HDC に相当した。一方、形質転換体は新たな HDC を産生し、これは *P. phosphoreum* の誘導性 HDC に相当した。また、受容菌本来の HDC の反応至適温度、pH および NaCl 濃度は各々 40℃、6.0 および 0%、および *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子産物の HDC については各々 30℃、7.0 および 0% で、これらは各々 *P. phosphoreum* の構成的 HDC および誘導性 HDC の至適条件と近似した。他方、HDC アミノ酸配列は *P. phosphoreum* と *M. morgani* を含む腸内細菌科の細菌との間で高いブートストラップ値で系統樹クレードを形成し、また高い相同性を示したが、分類学的に類似した *L. anguillarum* とは分岐した系統樹を形成し、また低い相同性を示した。

以上の結果から、*P. phosphoreum* は低温性細菌の HDC 活性に加えて中温性細菌の HDC 活性をもつこと、つまり鮮魚を含む水産食品の多様性からくる広範囲な環境で HDC 生成がなされることを示唆する。それ故、鮮魚の取扱いやその流通過程、調理の過程、および貯蔵に至る衛生的な取扱いがヒスタミン中毒の阻止や水産食品の品質保持には必要である。

第 8 章 後 記

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、ご懇切なご指導とご鞭撻を賜りました長崎大学生産科学研究科教授森井秀昭博士に厚くお礼申し上げます。また、本論文の作成にあたり、ご懇切なご助言をいただきました長崎大学生産科学研究科教授原研治博士、同小田達也博士、同

橘勝康博士、同荒川修博士に厚くお礼申し上げます。また、本研究の遂行と本論文の作成に関し多大な御協力を戴きました共同研究者の石本亮氏、和泉好彦氏、および Mr. Raul Herrera-Espinoza ならびに水産微生物学研究室学生各位に感謝します。

第9章 文 献

1. 相磯和嘉、豊浦秀世、中野啓吾. 1956. *Proteus morganii* の histidine decarboxylation について (第2報). *日本細菌学雑誌* 11: 517-520.
2. 飯田宏美. 1960. 食品細菌としての発光細菌 (Photobacterium

- 属)の研究. *日本衛生学会誌* 15: 103-113.
3. 海瀬好和. 1960. 海水性 *Aeromonas* の研究. *千葉医学会雑誌* 36: 149-156.
 4. 奥積昌世、栗野正石、大木由美. 1984. N-菌群 (低温好塩性ヒスタミン生成菌) のヒスタミン生成に及ぼす温度、pH および NaCl 濃度の影響. *日本水産学会誌* 50: 1757-1762.
 5. 河端俊治、石坂公成、三浦利之、佐々木忠尚. 1956. 水産食品の腐敗中毒に関する研究-VII. メバチ刺身によるアレルギー様食中毒とその原因細菌の検出. *日本水産学会誌* 22: 41-47.
 6. 河端俊治、内田大、赤野多恵子. 1960. イオン交換樹脂 (Amberlite CG-50) によるヒスタミンの簡易定量法. *日本水産学会誌* 26: 1183-1191
 7. 河端俊治、鈴木茂. 1959. 水産食品の腐敗中毒に関する研究-VIII. *Proteus* 菌群における ι -(α)-histidine 脱炭酸酵素の分布と *P. morganii* 洗浄菌体懸濁液の脱炭酸能と pH の関係. *日本水産学会誌* 25: 473-480.
 8. 河端俊治、鈴木茂. 1959. 水産食品の腐敗中毒に関する研究-IX. *Proteus morganii* の ι -(α)-histidine 脱炭酸酵素形成に関与する因子. *日本水産学会誌* 25: 481-487.
 9. 栗原欣也、我妻康弘、藤井建夫、奥積昌世. 1993. 好塩性ヒスタミン生成菌のヒスチジン脱炭酸活性に及ぼす培養条件の影響. *日本水産学会誌* 59: 1401-1406.
 10. 清水 潮. 1986. 海洋細菌-従属栄養細菌. 「海洋生物資源の探索と利用」(内藤 敦編) シーエムシー、東京. pp. 69-82.
 11. 清水亘、日引重幸. 1954. 水産物の腐敗に関する研究-XIII. 数種魚類の腐敗の比較 (1). *日本水産学会誌* 20: 298-301.
 12. 清水亘、日引重幸. 1954. 水産物の腐敗に関する研究-XIV. 魚種による腐敗の相違 (2). *日本水産学会誌* 20: 302-304.
 13. 清水亘、日引重幸. 1954. 水産物の腐敗に関する研究-XV. 丸・切身・挽肉・変性肉の腐敗の比較. *日本水産学会誌* 20: 388-391.

14. 日引重幸、清水亘. 1959. 水産物の腐敗に関する研究-27 包装・加熱魚類の腐敗におけるヒスタミン生成の抑制および魚介類のヒスチジン含量. *日本水産学会誌* **24**: 916-919.
15. 山中英明、塩見一雄、菊池武昭、奥積昌世. 1984. 赤身魚類の貯蔵中におけるヒスタミンの消長. *日本水産学会誌* **50**: 695-701.
16. 与口りお、奥積昌世、藤井建夫. 1990. 東京湾および相模湾沿岸海水における中温好塩性ヒスタミン生成菌の季節的消長. *日本水産学会誌* **56**: 1467-1472.
17. 与口りお、奥積昌世、藤井建夫. 1990. 市販鮮魚における好塩性ヒスタミン生成菌の季節的消長. *日本水産学会誌* **56**: 1473-1479.
18. Alin, K. 1950. Bacterial production and destruction of histamine in vitro. *Acta Allergologica* **III**:136-146.
19. Epps, H. M. R. 1945. Studies on bacterial amino-acid decarboxylase. 4. L-histidine decarboxylase from *Cl. welchii* type A. *Biochemical Journal* **39**:42-46.
20. Eitenmiller, R.R., Wallis, W. W., Orr, J. H. and Phillips, R. D. 1981. Production of histidine decarboxylase and histamine by *Proteus morgani*. *Journal of Food Protection* **44**: 815-820.
21. Eitenmiller, R. R., Orr, J. H., and Wallis, W. W. 1982. Histamine formation in fish: microbiological and biochemical conditions. In *Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products* (ed. by Martin, R. E. Flick, G. J., Hebard C. E., and Ward, D. R.) AVI Publishing Company, Westport, Connecticut. pp. 39-50.
22. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood. 1998. FDA and EPA guidance levels. In *Fish and fishery products hazards and controls guide*, 2nd ed. Appendix 5. pp. 245-8.

23. Ferencik, M. 1970. Formation of histamine during bacterial decarboxylation of histidine in the flesh of some marine fishes. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology* **14**: 52-60.
24. Fujii, T., Hiraishi, A., Kobayashi, T., Yoguchi, R., and Okuzumi, M. 1997. Identification of the psychrophilic histamine-producing marine bacteria previously referred to as the N-group bacteria. *Fisheries Science* **63**: 807-810.
25. Gale, E. F. 1940. The production of amines by bacteria. I. The decarboxylation of amino acids by strains of *Bacterium col.* *Biochemical Journal* **34**: 392-413.
26. Gale, E. F. 1941. The decarboxylation of amino-acids by organisms of the groups *clostridium* and *proteus*. *Biochemical Journal* **35**: 66-80.
27. Guirard, B. M. and Snell, E. E. 1987. Purification and properties of pyridoxal-5' -phospho-dependent histidine decarboxylases from *Klebsiella planticola* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology* **169**: 3963-3968.
28. Hidaka, T. 1965. Studies on the marine bacteria II. On the specificity of mineral requirements of marine bacteria. *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Kagoshima University* **14**:127-180.
29. Ienistea C. 1971. Bacterial production and destruction of histamine in foods and food poisoning caused by histamine. *Die Nahrung* **15**: 109-113.
30. Kawabata, T., Ishizaka, K, and Miura T. 1955. Studies on the allergy-like food poisoning associated with putrefaction of marine products I. Episodes of allergy-like food poisoning caused by “Samma Sakuraboshi” (dried seasoned saury) and other kinds of marine products. *Japanese journal of Medical*

- Science and Biology* **8**: 487-501.
31. Kimata, M. and Kawai, A. 1953. The freshness of the fish and the amount of histamine present in the meat. *Memoirs of the Research Institute for Food Science, Kyoto University* **5**: 25-54.
 32. Kimata, M. and Kawai, A. 1953. Biochemistry of *Achromobacter histamineum*. I. *Memoirs of the Research Institute for Food Science, Kyoto University* **6**: 3-11
 33. Kimata, M., Kawai, A., and Akamatsu, M. 1958. Classification and identification of the bacteria having an activity which can produce a large amount of histamine. *Memoirs of the Research Institute for Food Science, Kyoto University* **14**: 33-41.
 34. Kimata, M. and Kawai, A. 1959. Studies on the histamin-formation of *Proteus morgani* (continued). *Memoirs of the Research Institute for Food Science, Kyoto University* **18**: 1-7.
 35. Kimura, B., Hokimoto, S, Takahashi, H., and Fujii, T. 2000. *Photobacterium histaminum* Okuzumi *et al.* 1994 if a later subjective synonym of *Photobacterium damsela* (Love *et al.* 1981) Smith *et al.* 1991. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1339-1342.
 36. Koessler, K. K. and Hanke, M. T. 1919. Studies on proteinogenous amines. IV. The production of histamine by *Bacillus coli communis*. *Journal of Biological Chemistry* **39**: 539-584.
 37. Krieg, N.R. and Holt, J. G. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore/London.
 38. Lehane, L., and Olley, J. 2000. Histamine fish poisoning

- revisited. *International Journal of Food Microbiology* **58**: 1-37.
39. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
40. MacLeod, R. A. 1971. Salinity bacteria, fungi and blue-green algae, In *Marine Ecology* **1(2)** (ed. By Kinne, O.) Wiley-Interscience pp. 689-703.
41. MacLeod, R. A. and Onofrey, E. 1956. Nutrition and metabolism of marine bacteria VI. Quantitative requirements for halides, magnesium, calcium and iron. *Canadian Journal of Microbiology* **3**: 753-759.
42. Mellanby, E. and Twort, F. W. 1912. On the presence of β -imidazolethylamine in the intestinal wall; with a method of isolating a bacillus from the alimentary canal which converts histidine into this substance. *Journal of Physiology* **45**: 53-60.
43. Moeller, V. 1955. Simplified tests for some amino acid decarboxylase and for arginine dehydrolase system. *Acta pathologica et microbiologica scandinavica* **36**:158-172.
44. Morii, H., Cann, D. C., Taylor, L.Y., and Murray, C.K. 1986. Formation of histamine by luminous bacteria isolated from scombroid fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **52**:2135-2141.
45. Morii, H., Cann, D.C., and Taylor, L. Y. 1988. Histamine formation by luminous bacteria in mackerel stored at low temperature. *Nippon Suisan Gakkaishi* **54**:299-305.
46. Morii, H. and Kasama, K. 2004. Activities of two histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum* at different temperatures, pHs, and NaCl concentrations, *Journal of Food*

- Protection* , **67**: 1736-1742 .
47. Okuzumi, M., Okuda, S., and Awano, M. 1981. Isolation of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria from *Scomber japonicus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **47**: 1591-1598.
 48. Okuzumi, M., Okuda, S., and Awano, M. 1982. Occurrence of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria (N-group bacteria) on/in red meat fishes. *Bulletin of the Japanese society of scientific Fisheries* **48**: 799-804.
 49. Okuzumi, M. and Awano, M. 1983. Seasonal variation in numbers of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria (N-group bacteria) in seawater and on marine fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **49**: 1285-1291.
 50. Okuzumi, M., Yamanaka, H. and Kubozuka, T. 1984. Occurrence of various histamine-forming bacteria on/in flesh fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **50**: 161-167.
 51. Okuzumi, M., Yamanaka, H., Kubozuka, T., Ozaki, H., and Matsubara, K. 1984. Changes in numbers of histamine-forming bacteria on/in common mackerel stored at various temperatures. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **50**: 653-657.
 52. Payne, W. J. 1960. Effects of sodium and potassium ions on the growth and substrate penetration of marine Pseudomonad. *Journal of Bacteriology* **80**: 696-700.
 53. Recsei, P. A. and Snell, E. E. 1984. Pyruvate enzymes. *Annual Reviews of Biochemistry* **53**: 357-387.
 54. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J. G. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1*, Williams & Wilkins, Baltimore • London • Los Angeles • Sydney.

55. Stevenson, J. 1966. The specific requirement for sodium chloride for the active uptake of L-glutamate by *Halobacterium salinarium*. *Biochemical Journal* **99**: 257-260.
56. Taguchi, Y., Watanabe, T., Kubota, H., Hayashi, H. and Wada, H. 1984. Purification of histidine decarboxylase from the liver of fetal rats and its immunochemical and immunohistochemical characterization. *The Journal of Biological Chemistry* **259**: 5214-5221.
57. Tanase, S., Guirard, B. M., and Snell E. E. 1985. Purification and properties of pyridoxal 5' -phosphate-dependent histidine decarboxylase from *Morganella morganii* AM-15. *The Journal of Biological Chemistry* **260**: 6738-6746.
58. Taylor, S. L., Guthertz, L. S., Leatherwood, M., Tillman F., and Lieber, E. R. 1978a. Histamine production by food-borne bacterial species. *Journal of Food Safety* **1**: 173-187.
59. Taylor, S L. Lieber E R., and Leatherwood, M. 1978b. A simplified method for histamine analysis of foods. *Journal of Food Science* **43**: 247-250.
60. Tayler, S. L., Guthertz, L.S., Leatherwood, M., and Lieber, E.R. 1979. Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning. *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 274-278.
61. van Spreekens K. J. A. 1970. Histamine production by the psychrophilic flora. In *Seafood Quality Determination* (ed. by Kramer, D. K. and Liston), Proceedings of an International Symposium Coordinated by the University of Alaska Sea Grant College Program, Anchorage, Alaska, U.S.A., 10-14 November 1986. 309-319.
62. Yoshinaga, D. H. and Frank, H. A. 1982. Histamine-producing bacteria in decomposing Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*).

Applied and Environmental Microbiology 44:447-452.