

## DNB細菌のアミノ酸感受性

佐藤優行, 木村和代\*

SENSITIVITY TO AMINO ACIDS OF DNB  
BACTERIA ISOLATED FROM SOIL

Masayuki SATO and Kazuyo KIMURA\*

DNB bacteria, 31 strains, which can not grow on a full strength nutrient broth (NB) but on the diluted NB were isolated from soil. The growth of these DNB bacteria was inhibited by polypeptone and meat extract which were contained in the NB medium. The growth was also inhibited by amino acids mixture and vitamins mixture, and by a single addition of different amino acids. Some of the DNB bacteria were specially sensitive to amino acids such as lysine, arginine and cysteine. Their growth was affected by addition of 0.1 mM or less of arginine or cysteine in the medium. These show that the growth inhibition of some DNB bacteria in NB medium results from their sensitivity to some amino acids.

栄養培地 (NB培地; 1%ポリペプトン, 1%肉エキス, 0.5%NaCl) には生育できなくて, その10倍以上の希釈培地には生育できるというDNB細菌を31株土壌から分離した。NB培地中の成分のうちポリペプトン, 肉エキスいずれによっても生育が阻害される菌が14株, ポリペプトンのみによって阻害される菌が8株あった。これらの菌の多くはアミノ酸の混合液あるいはビタミンの混合液によっても生育阻害を受けた。混合アミノ酸による阻害が顕著であった菌8株については個々のアミノ酸 (5 mM) 単独添加の影響を調べた。アミノ酸によって阻害あるいは促進まちまちであったが, どの菌もリシン, アルギニン, システインに対してとくに感受性が強く, 0.1mMあるいはそれ以下の添加濃度でも生育が阻害される例があった。したがって, これらのDNB細菌が高栄養条件下で生育阻害を受ける原因の1つはアミノ酸に対する感受性にあるものと考えられる。

## 結 言

自然界には栄養物質の貧困な環境が多い。そういう低栄養条件下に好んで棲息している微生物も多い。これらの中には通常の栄養培地では生育できないものがある。Suwara<sup>(1)</sup>は土壌から分離した細菌を, 各種培地濃度における生育度から4つのタイプに分けた。そのうちのタイプⅢとⅣをDNB細菌と呼んだ。これらの細菌はNB培地 (1%ポリペプトン, 1%肉エキス, 0.5%NaCl) には生育できず, それを10倍以上希釈したDNB培地に生育できるものである。さらにHattoriら<sup>(2)</sup>は, これらDNB細菌が無機塩類およびアミノ酸, ビタミン, 有機酸などの有機物によって広く生育阻害を受けることを明らかにした。このような微生物の低栄養環境に適応する能力を生理学的に解明する

\* 朝日肥糧株式会社 (高松市朝日町4-11-1)  
Asahi Hiryo Co Ltd, 4-11-1 Asahimachi, Takamatsu-shi

ことは、栄養条件のきびしい環境でのサバイバル戦略を知る上に興味深い課題である。本研究では、まず土壌からDNB細菌を分離した。つぎにHattoriらと同様にNB培地成分中の生育阻害成分を調べるとともに、とくにアミノ酸による阻害についてより詳しく調べた。

### 実験材料および方法

1. 使用菌株 本実験で分離した細菌のほか、対照菌として当研究室保存の*Escherichia coli* IFO3544を用いた。
2. 培養 NB培地(1%ポリペプトン, 1%肉エキス, 0.5%NaCl, pH7.0)およびそれをイオン交換水で希釈したものを基本とした。なお、1万倍希釈培地には蒸留水をさらにイオン交換した水を用いた。またアミノ酸およびビタミンは原則として濾過滅菌した後培地に添加した。NB/10<sup>2</sup>に0.4%寒天を含む高層培地に穿刺培養することにより継代保存した。これを1白金耳NB/10<sup>2</sup>中に接種して4日間培養し、種培養とした。本培養には、100ml容平底培養ビンに各種培養液を50mlずつ入れ殺菌したものを培地に用いた。これに種培養0.1ml接種し、27℃で一定期間静置培養した。
3. 菌の分離と選択 種々な地域、場所から採取した土壌試料0.5gずつを殺菌水10mlに懸濁し、その上清液を殺菌水で1/10<sup>2</sup>あるいは1/10<sup>4</sup>に希釈した。各希釈液1mlをNB/10<sup>2</sup>寒天平板培地に接種し、これを27℃で培養した。培養5日以降14日までに出現したコロニーを釣菌し、まずNB/10<sup>2</sup>液体培地で静置培養した。ここに生育したものについてNB液体培地での増殖の有無を調べ、増殖しなかったものを選び、これを保存用のNB/10<sup>2</sup>高層培地に穿刺培養した。さらに穿刺培養から再度NB培地に接種して増殖しないことを確認した。なお、これら分離菌はすべて顕微鏡観察によりそのサイズから細菌と判断した。
4. 生育度の測定 培養液を攪拌した後、その一部を採取し、その600nmにおける吸光度を測定した。増殖の有無の判定には肉眼観察による。
5. 試薬 カザミノ酸はDIFCOのビタミン定量用のものを、ポリペプトンは日本製薬製を、肉エキス、寒天、各種アミノ酸およびビタミンは和光純薬工業からそれぞれ購入した。

### 実験結果

#### 1. DNB細菌の分離

香川県坂出市、三木町および長尾町の公園、住宅地、畑などから土壌試料を約40収集した。それらの懸濁液から得られたコロニーのうちNB培地に生育しなかったもの約100株を1次選択菌とした。これらを保存用高層培地に穿刺培養したのち、2度3度とNB培地にて生育しないことを確認し、2次選択菌として31株を得た。これらDNB細菌を各種希釈NB培地で静置培養し、Suwaらと同様にNB/10<sup>4</sup>に生育できるかできないか(600nmにおける吸光度が0.004以上増加するかどうか)によって類別すると、できるもの(タイプⅣ)が15株、できないもの(タイプⅢ)が16株であった。Fig 1に培地の希釈度によって生育の異なる典型的な3株について、生育の培地濃度依存性を示した。No.7株がNB/10<sup>4</sup>以下でも生育を示すタイプⅣ(偏性低栄養細菌)である。No.28株はタイプⅢのDNB細菌にあたる。対照に用いた大腸菌はNB/10<sup>2</sup>でもわずかしこ生育できないタイプⅠであった。

#### 2. 生育に及ぼすポリペプトンおよび肉エキスの影響

31株のDNB細菌について、NB培地中のポリペプトンおよび肉エキスが生育阻害を起こすかどうか調べた。NB/10<sup>2</sup>培地を基本培地とし、そこでの生育を対照とした。この培地にポリペプトンあるいは肉エキスを単独に1%にな

Table 1. Composition of Amino Acid Mixture and Vitamine Mixture

	Concentration
Amino acid mixture	
L-Lysine	0.68 (mM)
L-Arginine	0.57
L-Methionine	0.67
L-Cysteine · H <sub>2</sub> O	2.85
L-Leucine	0.76
L-Isoleucine	0.76
DL-Valine	0.85
L-Phenylalanine	0.61
L-Histidine	0.64
L-Threonine	1.68
L-Proline	0.87
L-Alanine	1.12
L-Glycine	0.76
L-Serine	0.95
L-Hydroxyproline	0.76
L-Tyrosine	0.55
L-Tryptophan	0.49
L-Glutamic acid	0.68
L-Aspartic acid	0.75
Total	2400 (mg/L)
Vitamine mixture	
Thiamine hydrochloride	0.0059 (μM)
Nicotinamide	1.64
Riboflavin	2.66
Pyridoxine hydrochloride	0.97
Calcium pantothenate	0.42
D-Biotin	0.0082
Inositol	11.1

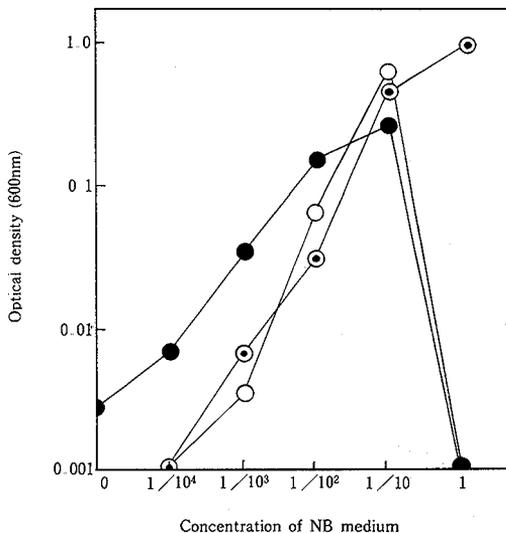


Fig.1 Growth of three bacteria at different concentrations of NB medium.

No 7(●)and 28 (○) strains were grown for 10 days and *Escherichia coli*(⊙)for 4 days.

るよう加えた各培地を用いて、それぞれの生育を比べた。その結果、ポリペプトン、肉エキスのいずれによっても生育阻害を受けたものが15株、ポリペプトンによって阻害を受けるが肉エキスによっては受けないものが8株あった。しかし肉エキスによって阻害を受けるがポリペプトンによって受けないものはなかった。残りのものはポリペプトンおよび肉エキスによっては阻害されず、NaClによってのみ阻害を受けた。ただし、2株はいずれの成分によっても阻害を受けなかった。

### 3. 生育に及ぼすアミノ酸およびビタミンの影響

ポリペプトンおよび肉エキス中に含まれているアミノ酸とビタミンについてその生育阻害を調べた。まず19種のアミノ酸混合液あるいは8種のビタミン混合液をNB/10<sup>2</sup>培地に添加して、それぞれの生育を無添加の場合と比較した。各添加物の培地中の濃度はTable 1に示した。その結果、混合アミノ酸、混合ビタミンいずれによっても生育阻害を受けたものが14株、混合アミノ酸の方だけに阻害を受けたものが10株、またいずれによっても受けなかったも

Table 2. Effect of Amino Acids on the Growth of DNB Bacteria

Amino acids	Concentration (mM)	Strain number of DNB bacteria							
		3	5	7	24	26	27	29	30
L-Lysine	5	I	I	I	I	I	I	I	I
L-Arginine	5	I	I	I	I	I	I	I	I
L-Methionine	5	I	I	I	I	I	I	N	I
L-Cysteine·H <sub>2</sub> O	5	I	I	I	I	I	I	I	I
L-Leucine	5	E	I	E	I	I	I	E	E
L-Isoleucine	5	N	E	N	I	I	N	E	E
DL-Valine	5	I	I	I	I	I	I	N	I
L-Phenylalanine	5	E	I	N	I	I	I	E	I
L-Histidine	5	E	I	I	I	I	I	I	I
L-Threonine	5	N	I	N	I	I	I	E	E
L-Proline	5	E	N	E	E	N	I	E	N
L-Alanine	5	I	I	E	I	I	I	E	E
L-Glycine	5	I	I	E	I	I	I	I	I
L-Serine	5	I	I	E	E	E	I	E	E
L-Hydroxyproline	5	N	I	E	I	E	N	N	I
L-Tyrosine	0.4	E	I	E	N	I	E	E	I
L-Tryptophan	5	I	I	N	I	I	I	E	I
L-Glutamic acid	5	E	I	E	I	I	I	E	E
L-Aspartic acid	5	E	I	I	I	I	E	E	N
Casamino acids	0.5 (%)	I	I	I	I	I	I	I	I

Growth in NB/100 supplemented with a single amino acid for 8 days was compared to that in NB/100. I, E and N are inhibition, enhance and no effect on growth, respectively.

のが7株あった。しかし混合ビタミンのみによって阻害されたものはなかった。

アミノ酸による生育阻害が明らかであったので、つぎに19種のアミノ酸をそれぞれ単独に添加した場合およびカザミノ酸を添加した場合について同様の実験をした。ここでは前の実験で比較的強い阻害を受けた8株についてのみ行なった。各アミノ酸添加による生育への影響をTable 2にまとめた。どの菌も種々のアミノ酸単独で生育阻害を受けた。またどのアミノ酸も1株以上の菌に対して阻害を示した。アミノ酸の中には生育促進の効果を示したのもあった。リシン、アルギニン、ヒスチジンの各塩基性アミノ酸およびシステイン、およびカザミノ酸などが多くの菌株に対して生育阻害を示した。

#### 4. リシン、アルギニン、およびシステインに対する感受性

標記の3種アミノ酸が5mM添加によって明かな生育阻害を示したので、これらについてさらに低い添加濃度における影響を調べた。各アミノ酸の添加濃度を0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 5.0mMとして8日間静置培養した。無添加のものとは比べ明かな生育阻害を示したものをTable 3にまとめた。0.9mM以下でも阻害を受けた場合が多く、アルギニンおよびシステインでは0.1mM添加でも阻害を受けた菌があった。また菌によっては、ある濃度以下で生育促進効果を受けるものもあった。さらに、アルギニン、システインについては添加濃度0.1mM以下での感受性を調べ

Table 3 Effect of Lysine, Arginine and Cysteine on the Growth of DNB Bacteria

Amino acids	Concentration (mM)	Strain number of DNB bacteria					
		3	5	24	26	27	30
L-Lysine	0.1	E	N	E	E	N	N
	0.3	N	W	E	S	N	E
	0.9	W	W	S	S	S	S
	2.7	S	S	S	S	S	S
	5.0	S	S	S	S	S	S
L-Arginine	0.1	N	N	S	W	N	E
	0.3	W	N	S	S	E	E
	0.9	S	W	S	S	S	W
	2.7	S	S	S	S	S	S
	5.0	S	S	S	S	S	S
L-Cysteine	0.1	W	W	S	W	N	S
	0.3	S	S	S	S	E	S
	0.9	S	S	S	S	E	S
	2.7	S	S	S	S	S	S
	5.0	S	S	S	S	S	S

Growth in NB/100 supplemented with a single amino acid for 8 days was compared to that in NB/100. S and W are strong and wweak inhibition effect on growth, respectively. E and N are enhance and no effect on growth, respectively.

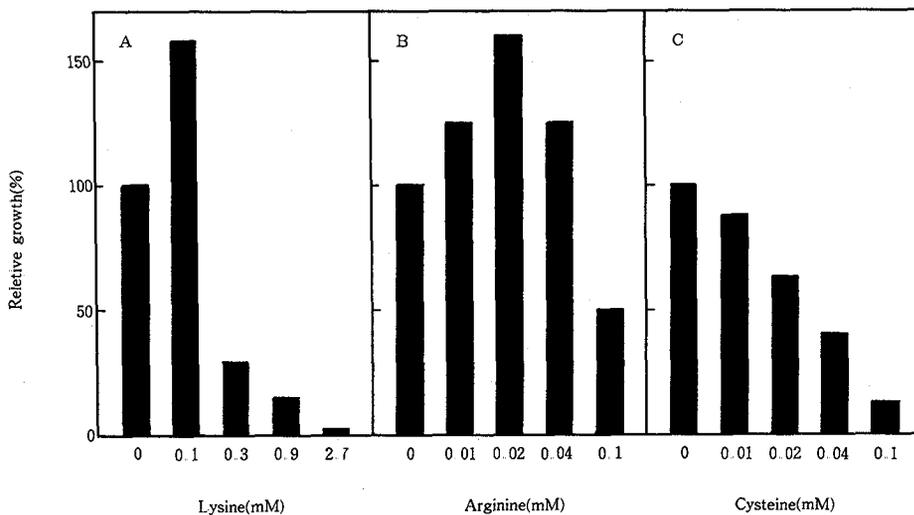


Fig.2. Effect of lysine, arginine and cysteine on growth of No. 26, 24, and 27 strain, respectively.

Growth in NB/100 supplemented with a single amino acid for 8 days was compared to that in NB/100. A, No. 26 ; B, No. 24 ; C, No. 27.

た。以上の実験例としてNo.26菌株に対するリシン, No.24に対するアルギニン, No.27に対するシステインの各影響をFig. 2に示した。No.24では0.1mMでもすでに明らかな阻害が観察され, No.27では0.01mMでも少し阻害され, 濃度が高くなるにしたがって阻害が強くなることが観察された。ただし, ポリペプトンと肉エキス中の各アミノ酸分析値<sup>(3)</sup>から計算すると, 基本培地NB/10<sup>2</sup>の中にはリシンが約0.07mM, アルギニンが約0.03mM, システインが約0.01mM含まれている。したがって, 表および図に示した添加濃度にこれらの値を加算したものが実際に各培地に含まれる濃度になる。

## 考 察

1980年にHattoriら<sup>(2)</sup>は, 土壌から分離したDNB細菌のアミノ酸, ビタミン, 有機酸に対する感受性について報告した。そこでは, 12種のアミノ酸10mM (ただし, イソロイシン, トリプトファン, アスパラギンはそれぞれ12.5, 5, 25mM) が各々単独にNB/10<sup>2</sup>培地に添加され生育におよぼす影響が調べられた。本研究では19種のアミノ酸について5mMずつ添加して調べた。アミノ酸によって, また菌株によって阻害程度はまちまちであるが, どのアミノ酸も単独でどれかの菌株に対して阻害を示したという点は, Hattoriらの結果と同様であった。10あるいは5mMという添加濃度は, NB培地中のポリペプトンと肉エキスに含まれると予想される各アミノ酸濃度<sup>(3)</sup>に近いことから, これらの細菌がNB培地に生育できない原因の1つは, 各菌のアミノ酸感受性にあると予想される。

Hattoriらは同時に, セリンによる阻害がスレオニン, アラニン, ロイシン, バリンの共存によって回復する例を示し, 単独アミノ酸による阻害は栄養のバランスが崩れることによって生ずるのかもしれないと, 考察している。本研究でも, 菌株によってはNB/10培地でよく生育するにもかかわらず, その時含まれると考えられる濃度より低い濃度のリシン, アルギニン, システインの単独添加によって生育阻害を受けた。このことはHattoriらの考察を支持している。一方, 使用した31株のうち24株は19種のアミノ酸混合液 (個々のアミノ酸濃度は5mMよりかなり低い) で生育阻害を受けた。したがって, 種々のアミノ酸が共存していてもそのうちのある特定のアミノ酸が限界以上に含まれておれば, そのことだけで生育阻害を受ける菌も多いものと考えられる。

一般にアミノ酸は微生物の発育に必要な因子であり, バクテリアの発育には通常個々のアミノ酸が5~50mg/Lあるいはそれ以上要求される。大腸菌などの栄養要求変異株に対する要求アミノ酸添加濃度もその程度である。<sup>(4)</sup>ところが, DNB細菌ではその程度の濃度でもアミノ酸の種類によって, あるいは菌株によっては明らかな生育阻害が認められた。今回の実験では, リシン, アルギニンといった塩基性アミノ酸およびシステインに対して強い感受性を持つ菌の存在が分かった。これらアミノ酸の阻害度は一般的な抗菌物質と濃度と比較すると, エタノールやフェノールより強く, サリチル酸やホモスルファミンなどに匹敵することになる。<sup>(5)</sup>さらに広く調べれば他のアミノ酸に対して特異的に感受性が強い菌も存在するものと考えられる。

海洋細菌でもそのような感受性をもったものがあると予想される。海洋中のアミノ酸濃度はきわめて低い (全遊離型アミノ酸として30~80 $\mu$ g/L程度<sup>(6)</sup>) ことから想像される。しかし, 海洋の低栄養細菌の研究は盛んに行なわれているにもかかわらず, アミノ酸に対する感受性についてはわずかな報告しか見当たらない。Akagiら<sup>(7)</sup>は海水から単離した低栄養細菌が1000mg C/Lのアラニンにより強い生育阻害を受けるが, 100mg C/Lでは受けないこと, および同じ菌株を使ってMartinら<sup>(8)</sup>は1000mg C/Lのアラニンとフェニルアラニンで強く阻害され, 10mg C/Lでは阻害されないことをそれぞれ報告している。これらの阻害濃度は本研究で用いた5mMよりかなり高い。このことは予想外である。

今後, われわれは偏性低栄養細菌 (前述のタイプIV) を対象にして, 微量栄養素の吸収代謝能力の面と共に, ア

ミノ酸, ビタミン, 糖類などの有機物による生育阻害機構についても追求し, これらの菌のサバイバル戦略の一端を探っていきたい。

## 謝 辞

本研究をはじめのあたり, 貴重な助言と励ましをいただいた東北大学遺伝生態研究センター服部 勉教授に深く感謝いたします。また種々の助言と討論をいただいた本学部横山和平博士に感謝いたします。

## 引 用 文 献

- (1) SUWA, Y. and T. HATTORI; *Soil Sci. Plant Nutr.*, **30**, 397-403 (1984).
- (2) HATTORI, R. and T. HATTORI; *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **26**, 1-14 (1980).
- (3) 協和発酵東京研究所編; 微生物実験マニュアル, 266-267, 講談社, (1986).
- (4) 微生物研究法懇談会編; 微生物学実験法, 303, 講談社, (1975).
- (5) 柳田友道; 微生物科学 2, 417, 学会出版センター, (1981).
- (6) SIEGEL, A. and E. T. DEGENS; *Science*, **151**, 1098-1101 (1966).
- (7) AKAGI, Y., U. SIMIDU and N. TAGA; *Can. J. Microbiol.*, **26**, 800-806 (1980).
- (8) MARTIN, P. and R. MACLEOD; *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1017-1022 (1984).

(1991年5月31日受理)