

低栄養細菌は優れた走化性を持っていなかった

佐藤優行, 三村佳代子, 川口啓介, 志度聡一郎,
木村義雄, *横山和平

A EXCELLENT CHEMOTAXIS IS NOT ESSENTIAL IN GROWTH
OF OLIGOTROPHIC BACTERIA

Masayuki SATO, Kayoko MIMURA, Keisuke KAWAGUTI,
Souichiro SIDO, Yoshio KIMURA, * Kazuhira YOKOYAMA

Oligotrophic bacteria (Y-26, Y-95, Z-06) cells are shown to be not significantly attracted to dilute NB media, sugars, L-amino acids, organic acids. A excellent chemotaxis is not essential in growth of these oligotrophic bacteria in a low nutrient condition.

key words : oligotrophic bacteria, chemotaxis

緒 言

低栄養細菌は、たとえば有機炭素源濃度 1 ppm というきわめて僅かな栄養源を利用して生育できる従属栄養細菌のことである。⁽¹⁾ これらの細菌は生きるために僅かな栄養源を上手に捕らえて、利用しなければならない。

低栄養細菌は運動性(べん毛)を持つものが多い。べん毛を使って栄養源のある方向へ移動できる。その時僅かな栄養源の存在を感知する能力を持っておれば、それだけ有利になると考えた。どのような栄養源に対して、どのくらい微量の栄養源(感度)に対して反応できる走化性を持っているか知ることは興味ある問題である。

そこで本実験では、典型的な低栄養細菌である3株を使って、果たしてこれらはNB希釈培地, 糖, アミノ酸, 有機酸に対して走化性を示すのか調べた。そして大腸菌や枯草菌などと比べてみた。

実験材料および方法

1. 使用菌株および培養

研究室で分離された偏性低栄養細菌 *Chromobacterium* sp. Y-95, *Aeromonas* sp. Y-26, および *Aeromonas* sp. Z-06 を使用した。⁽¹⁾ 対照菌として大腸菌 (*Escherichia coli* IFO 3301) のほか *Bacillus subtilis* IFO 13719 も用いた。

低栄養細菌の培養はNB培地(1%ポリペプトン, 1%肉エキス, 0.5%NaCl)を水で100倍に薄めた培地を用い、

5日間静置した。対照菌はNB培地を用い2日間振盪培養した。

2. 菌数の測定

全菌数は細菌用の菌数計算盤を用いて、光学顕微鏡観察によるダイレクトカウント法によった。生菌数は、 $1/10^2$ NB寒天培地を用いてコロニーカウントによった。

3. 菌懸濁液の調製

培養液から、低栄養細菌の場合は6000rpm, 10分, 対照菌の場合は5000rpm, 5分の条件の遠心分離により、集菌した。これを走化性緩衝液(10mMリン酸カリウム, 0.1mM EDTA ナトリウム, pH7.0)を用いて2回洗浄した。この洗浄菌体を $6 \sim 20 \times 10^7/ml$ 濃度になるよう走化性緩衝液に懸濁した。

4. 走化性試験

J. ADLER が開発したキャピラリー法⁽²⁾によった。すなわちU字形に整形したステンレスクリップをスライドガラス上にスペーサーとして載せ、その上にカバーガラスを被せる。スライドガラスとカバーガラスの隙間に上記の菌懸濁液を入れる。一端を封管し、検定物質—走化性緩衝液の入った内径0.2mmの $1 \mu l$ キャピラリー(EMミニキャップス)を菌懸濁液に差し込む。30°Cで60分間の後、キャピラリーに入り込んだ菌数を $1/10^2$ NB寒天平板上で測定した。コントロールとしては、検定物質の代わりに走化性緩衝液のみの入ったキャピラリーを用いた。一つの検定物質につきキャピラリー3~5本を使い、その平均値を求めた。また各糖および各アミノ酸を検定物

*現在：山口大学農学部生物資源科学科

質に用いる時は、低栄養細菌には0.1mMの濃度で、対照菌の場合には1mMの濃度で使った。

この操作はすべて無菌的に行なった。

実験結果

1. NB希釈培地に対する走化性

ポリペプトン1%, 肉エキス1%, NaCl 0.5%というNB培地およびその水希釈液は、低栄養細菌生育の栄養濃度依存性を判定するのに使われてきた。そこで検定物質としてNB培地の各水希釈液を用いた。キャピラリーにNB培地, 1/10NB, 1/10²NB, ... 1/10⁶NBを入れ、それぞれに対して走化性を調べた。同時に各NB希釈液に対する生育との関係を調べた。

Fig. 1はその結果を示す。Y-95株は、1/10⁴NB以上1/10NBまで増殖するのに、走化性は1/10NBまでは誤差範囲で、NBではじめて示した。それに対して*B. subtilis*では1/10³NB以上で増殖しはじめ、走化性も同じ濃度から示しはじめた。

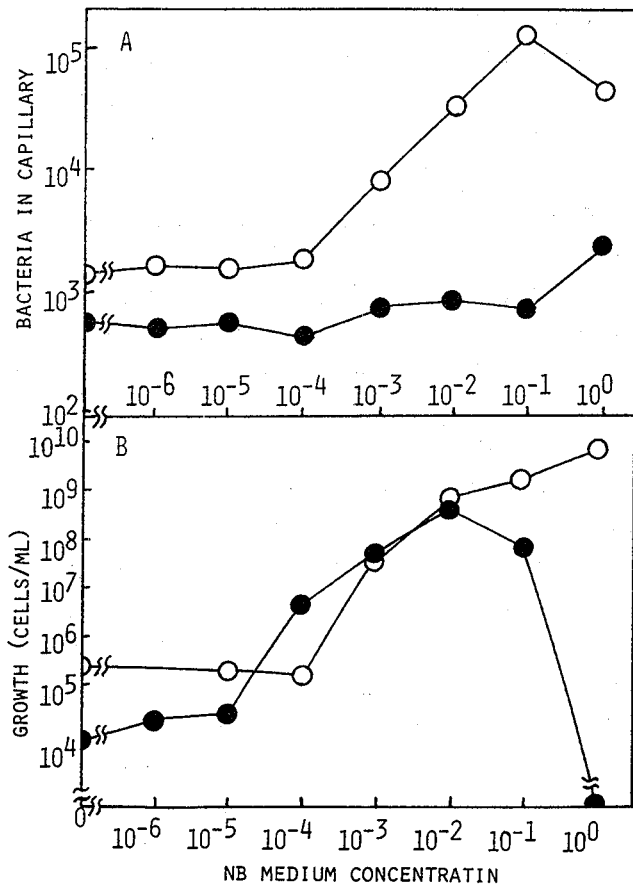


Fig.1. Concentration response curve (A) and growth (B) of Y-95 (●) and *Bacillus subtilis* (○) toward dilute NB media.

2. 糖に対する走化性

天然に広く分布している4種のヘキソースに対する低栄養細菌 (Y-26, Y-95, Z-06) および *E. coli* の走化性を調べた。Table 1に見られるように、ここに用いた低栄養細菌はことごとく誘引を示さないか、コントロールに比べ2~3倍とわずかであった。それに対して *E. coli* はグルコースやマンノースに対してコントロールに比べ30な

Table 1. Chemotactic responses of oligotrophs (Y-26, Y-95, Z-06) and *E. coli* toward various D-hexoses.

D-Hexoses	Relative response*			
	Y-26	Y-95	Z-06	<i>E. coli</i>
Control	1	1	1	1
D-Glucose	0.7	1.3	0.7	34
D-Galactose	1.7	1.0	0.9	2.0
D-Mannose	3.2	0.5	0.5	15
D-Fructose	1.2	0.4	0.8	2.0

* The relative response is expressed as the relative number of bacteria in the capillary with D-hexoses compared with control.

Table 2. Chemotactic responses of oligotrophs (Y-26, Y-95, Z-06) and *E. coli* toward various L-amino acids.

L-Amino acids	Relative response*			
	Y-26	Y-95	Z-06	<i>E. coli</i>
Control	1.0	1.0	1.0	1.0
L-Alanine	0.8	3.3	1.7	12
L-Arginine	0.8	1.4	2.9	1.1
L-Asparagine	1.2	3.4	0.2	81
L-Aspartate	1.2	2.6	0.2	8.0
L-Cysteine	0.6	3.4	1.1	1.6
L-Glutamate	1.7	3.2	2.8	26
L-Glutamine	1.3	0.5	0.9	0.6
Glycine	1.8	1.5	0.7	17
L-Histidine	0.6	2.9	0.8	0.9
L-Isoleucine	1.4	2.1	0.4	0.6
L-Leucine	0.7	0.5	0.7	1.7
L-Lysine	0.8	1.3	1.7	4.9
L-Methionine	1.7	0.9	0.7	1.7
L-Phenylalanine	0.9	3.2	1.1	1.0
L-Proline	0.9	3.3	1.7	6.1
L-Serine	2.5	6.5	0.9	8.2
L-Threonine	1.4	0.8	1.0	18
L-Tryptophan	1.0	0.5	1.0	0.7
L-Tyrosine	1.2	0.5	1.4	0.5
L-Valine	1.0	2.9	0.6	1.1

* The relative response is expressed as the relative number of bacteria in the capillary with L-amino acids compared with control.

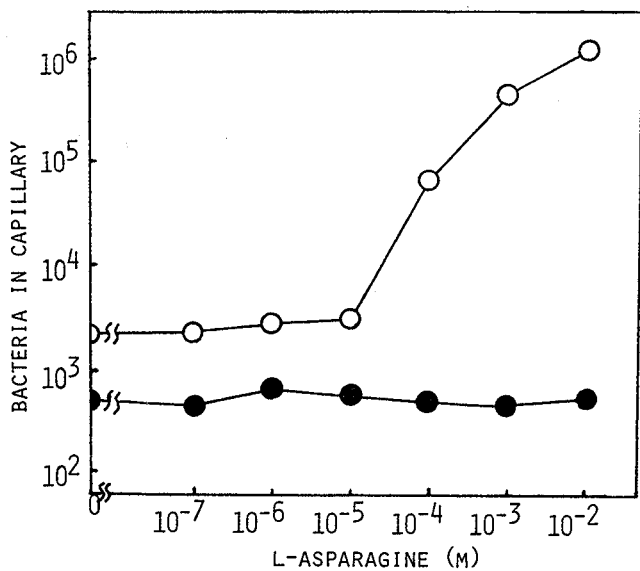


Fig 2. Concentration response curve of Y-95 (●) and *Escherichia coli* (○) toward L-asparagine.

いし15倍の誘引を示した。ただしガラクトース、フラクトースには示さなかった。

3. アミノ酸に対する走化性

20種類の天然型L-アミノ酸について、低栄養細菌(Y-26, Y-95, Z-06)および*E. coli*の走化性を調べた。結果をTable 2に示した。実験に用いた低栄養細菌はどのアミノ酸に対しても、高くてもコントロールの2~3倍程度の誘引しか示さなかった。ただしY-95はセリンに対し6.5倍示した。それに対して、*E. coli*はL-アスパラギンに最も高く、L-グルタミン酸、グリシン、L-スレオニン、L-アラニンなどに高い誘引(コントロールの80~10倍以上)を示した。

つぎにY-95, *E. coli*を用いて各種濃度のL-アスパラギンに対する走化性を調べ、感受性を示す最低濃度すなわち閾値を求めた。Y-95ではどの濃度でも有意な差はなく、閾値は求められなかった。*E. coli*では 10^{-5} M付近に閾値が見られた。

4. 有機酸に対する走化性

クエン酸回路のメンバーであるクエン酸、コハク酸、リンゴ酸に対する走化性を低栄養細菌(Y-26, Y-95, Z-06)について調べた。これら有機酸に対しては全く誘引を示さなかった。一方、*E. coli*はコハク酸に対してコントロールの約10倍の誘引を示した。

考 察

低栄養細菌 Y-95は $1/10^4$ に希釈したNB培地にも生育できるにもかかわらず、 $1/10$ NB以下の培地に対して走化

性を全く示さなかった。NB培地中のポリペプトンや肉エキスに含まれる個々のアミノ酸に対しても有意な反応を示さなかった。糖および有機酸に対しても同様の反応であった。Y-26, Z-06菌株でも同様であった。

したがって、これら3菌株は、低栄養条件下で生きる上に、わずかな栄養源を感知し、それに向かう優れた走化性を必要としないものと思われる。

走化性が全くないというわけでもない。キャピラリー法ではコントロールに対し2, 3倍とわずかに反応するものもあった。寒天平板培地を用いたスワーム法だと、3~4日後コロニーが広がった。持っけていてもキャピラリー法でははっきりしないほど弱い走化性である。

栄養物質の存在を敏感に察知して、その方向へ走ることとは高栄養細菌のすることである。彼らと行動を共にしないところに低栄養細菌の生きる道を求めた。つまりあえて高栄養細菌たちが集まるところで栄養源を奪い合わない。栄養濃度による棲み分けを行っているのではないか。

対照のために用いた*B. subtilis*や*E. coli*では他の文献^(3,4)にあるのとほぼ同程度の結果が得られたので、本実験結果が低栄養細菌においてのみ間違っていると考えられない。

要 約

低栄養細菌 Y-95, Y-26, Z-06菌株は、NB希釈液にも、糖、アミノ酸、有機酸にも有意な走化性を示さなかった。これらの菌は低濃度の栄養源を利用するため格別に優れた走化性を必要としなかった。

謝 辞

応用酵素化学研究室の何森 健教授に有益な議論とアドバイスを賜った。深く感謝申し上げる。

引用文献

- 1) KIMURA, Y., UENO, Y., KAJIKAWA, K., NAKAMURA, T., and SATO, M.: *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.*, 10, 21-29 (1995).
- 2) ADLER, J.: *J. Gen. Microbiol.*, 74, 77-91 (1973).
- 3) MESIBOV, R., and ADLER, J.: *J. Bacteriol.*, 112, 315-326 (1972).
- 4) ORDAL, G. W., and GIBSON, K. J.: *J. Bacteriol.*, 129, 151-155 (1977).