

低温好塩性発光細菌 *Photobacterium phosphoreum* の ヒスタミン生成に関する研究

生産科学研究科 笠間憲太郎

サバ科魚類などの赤身魚の摂食によるアレルギー様食中毒の主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。ヒスタミン生成中温細菌の報告は多いが、低温細菌は *Photobacterium phosphoreum* に限られる。したがって、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の維持には *P. phosphoreum* のヒスタミン生成条件を知る必要がある。また、魚肉中のヒスタミン量は輸入規制の項目になりつつある。そこで、本研究では低温貯蔵魚でのヒスタミン生成と *P. phosphoreum* との関連性、低温貯蔵魚から分離した同菌のヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）産生能および HDC の活性に及ぼす環境因子の影響、および *Escherichia coli* へ導入された *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）および氷冷（氷と魚体が直接に接触しない）下に保存したサバでの *P. phosphoreum* の消長とヒスタミン生成との関係を調べた。その結果、両貯蔵下のいずれのサバとも、表皮や筋肉外層では *P. phosphoreum* を認めず、ヒスタミン量も極めて少なかった。一方、腹部内壁では両貯蔵下とも *P. phosphoreum* が増殖し、有意なヒスタミンの蓄積を氷冷下で認めた。これらの結果から、ヒスタミンの生成には *P. phosphoreum* とその生育環境が深く関連することを示唆した。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、洗浄菌体と菌体抽出液は生育温度より極めて高い温度でも HDC 活性を示した。しかし、ヒスタミン生成 pH は生育 pH とほぼ類似した。洗浄菌体でのヒスタミン生成は 2~4% NaCl 存在下で良好で、生育も同傾向を示したが、菌体抽出液では 0% NaCl でその生成量は最大となった。HDC 産生能は嫌気状態では好気状態の約 2 倍となった。ところで、細菌によるヒスタミン生成に及ぼす酸素分圧の影響については相反する結果が報告されており、また菌体抽

出液を凍結保存したとき、HDC 活性が貯蔵初期に低下し、後に一定に保たれたことから、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だったが、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した。誘導性 HDC はジチオトレイトールで安定化されたが、構成的 HDC は若干不安定であった。以上のように、*P. phosphoreum* には二つの HDC が存在したことから、

第 5 章では培養温度、pH、NaCl 濃度および海水濃度が *P. phosphoreum* の構成的および誘導性 HDC の産生に及ぼす影響を調べた。その結果、7°C、pH6.0、5% NaCl および全海水下で HDC 産生能が最大となり、それは誘導性 HDC に依存した。なお、塩の影響は種類ではなく濃度が関与した。他方、構成的 HDC と誘導性 HDC の反応至適条件および反応の範囲がこの両者で異なり、*P. phosphoreum* によるヒスタミンの生成がより広い環境下で起こることを示唆した。以上のように *P. phosphoreum* の二つの HDC では反応条件が異なったことから、

第 6 章では *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子を導入した *E. coli* を用い、発現した HDC の性質を調べた。また、同菌と中温性ヒスタミン生成菌の HDC の進化的な違いを分子系統樹を用いて調べた。その結果、*E. coli* に導入された *P. phosphoreum* の HDC 遺伝子は誘導性 HDC の遺伝子であった。また、受容菌 *E. coli* BL21 (DE3) はそれ本来の HDC を産生し、その HDC の分子量と反応条件は *P. phosphoreum* の構成的 HDC と近似した。他方、HDC のアミノ酸配列は *P. phosphoreum* と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たが、分類学的に類似した *Listonella anguillarum* とは分岐した系統樹を形成した。

以上の結果から、*P. phosphorous* は低温性 HDC に加えて中温性 HDC 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を阻止するために必要である。