

[ 報文 ]

## 魚粉等の飼料原料から分離された放射線抵抗性 *Acinetobacter* 菌株の DNA 相同性と放射線感受性

伊藤 均

元日本原子力研究所高崎研究所 ( 現独立行政法人農業食品産業総合研究機構食品総合研究所 )  
( 〒 370-0884 群馬県高崎市八幡町 935-6 )

### Radiation-sensitivities and DNA homology of radiation-resistant *Acinetobacter* strains isolated from ingredient of animal feeds such as fish meals

Ito Hitoshi

formally Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, Japan Atomic Energy Research Institute  
935-6, Yahata-machi, Takasaki, Gunma 370-0884 Japan

#### Summary

Seven typical strains belonging to genus *Acinetobacter* were isolated from fish meals and bone meals. Guanine + cytosine contents of DNA of these strains were ranged to be 41 to 45%. Many taxonomic characteristics of strains of F1, F14, F50, B4 and J5 were similar to *A. radioresistens* FO-1, and DNA homology values were obtained to be 71 to 92% compared with 100% of *A. radioresistens* FO-1. On the contrary, strains of J16 and J22 had similar characteristics with *A. calcoaceticus* ATCC23055 and also each DNA homology values were obtained to be 37% compared with *A. radioresistens* FO-1. Their  $D_{10}$  values of strains F1, F14, F50, B4 and J5 in gamma-rays under air-equilibrium were also obtained to be 0.60 to 1.70 kGy as similar radiation-resistance with 1.70 kGy of *A. radioresistens* FO-1. However,  $D_{10}$  values of J16 and J22 were obtained to be 0.35 kGy as similar to 0.12 kGy of *A. calcoaceticus* ATCC23055.

**Key words:** radiation-resistant *Acinetobacter*, radiation sensitivities,  $D_{10}$  values, DNA homology values, G + C contents of DNA, taxonomic characteristics, animal feeds, fish meals

#### はじめに

飼料用魚粉等の放射線殺菌の研究<sup>1)</sup>を行っていた際に多数分離された放射線抵抗性のグラム陰性球桿菌は、オキシダーゼが弱陽性と判定されたため仮に *Moraxella* に分類しておいたが、その後の分光光度計によるチトクローム波長の測定やオキシダーゼ活性を詳細に調べた結果から *Acinetobacter*

に属すと推定された。魚粉等から分離されたこれらの *Acinetobacter* に属す可能性のある菌株の多くは 10kGy 以上でも生残しており、大腸菌群検査用培地の MacConkey agar 平板培地上でも白色コロニーとして出現することがある。放射線抵抗性の *Acinetobacter* としては生理用綿製品から分離された *Acinetobacter radioresistens* が報告されているが<sup>2)</sup>、本報告では分類学的性質や DNA 相同性、放射線感

受性を比較することによって、食品等での放射線抵抗性 *Acinetobacter* の分布の可能性について検討した。

### 実験方法

#### 1. 供試菌株

照射魚粉を含む動物性タンパク質混合ミールや東南アジア産魚粉より *Acinetobacter* と推定された代表株 F1, F14, F50, B4 を Nutrient agar より分離した<sup>1)</sup>。また、非照射骨粉等から MacConkey agar 上の大腸菌群コロニーの 5 ~ 10% を占めた白色コロニーより代表株 J5, J16, J22 を分離した<sup>1)</sup>。比較としては標準株の *A. radioresistens* FO-1 株, *A. calcoaceticus* ATCC23055 株, *Moraxella osloensis* CCM5605 株を用いた。

#### 2. 分類学的性質と DNA - DNA 相同性

分類学的性質は Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>3)</sup> に従って調べた。DNA の抽出は既定的方法で行い<sup>4)</sup>, G + C 含量 (グアニンとシトシンの mol % 比) は熱変成曲線の T<sub>m</sub> より求めた<sup>5)</sup>。DNA 相同値は 0.15M NaCl+0.15M Na<sub>3</sub>Citrate 水溶液に *A. radioresistens* FO-1 株または *A. calcoaceticus* ATCC23055 株の精製 DNA と試験菌株の精製 DNA を波長 260nm の吸光度で 1.0 になるように別々に溶かし, 100 で約 5 分加熱して 1 本鎖 DNA とした。急冷して 65 に保ち試験菌株と標準菌株の両者を合わせ, 65 の定温で 20 ~ 60 分にわたって 260nm での吸光度減少を調べ, 試験菌株の DNA 吸光度減

少との比較によって相同値を算出した<sup>4, 6)</sup>。

#### 3. 放射線感受性

各菌株を 30 で 1 ~ 2 日間振とう培養して得られた定常期細胞を洗浄後に 0.067M 磷酸緩衝液に懸濁し, 日本原子力研究所高崎研究所の食品照射ガンマ棟 (100Ci) において溶存空気平衡下で照射して生残菌数より生存曲線および D<sub>10</sub> 値を求めた。照射位置の線量率はあらかじめ Fricke の鉄線量計で測定しておいた。

### 実験結果および考察

魚粉等の飼料原料から分離された *Acinetobacter* に属す可能性のある各菌株は Table 1 に示すように 0.4 ~ 0.8 μm 巾の単球菌および単球桿菌, または 2 連菌であり, *Moraxella* 属と比べオキシダーゼが陰性の点を除いては分類学的性質に大差が認められなかった。ウレアーゼ活性は *M. osloensis* CCM5605 と J16, J22 および *A. calcoaceticus* ATCC23055 株が陽性であるのに対し, F1, F14, F50, B4, J5 および *A. radioresistens* FO-1 株は陰性であった。また, glucose, xylose, mannose, lactose 分解能は *A. calcoaceticus* ATCC23055 と J16, J22, B4 株が陽性であるのに対し, 他の菌株は陰性であった。

一方, *M. osloensis* CCM5605 株以外の各菌株は maltose, ethanol, L-tyrosine, L-arginine, L-ornithine などの資化能が認められた。DNA の G + C 含量は Table 2 に示すように各菌株とも 41.1 ~ 44.7% と

Table 1 Typical taxonomic characteristics of *Acinetobacter* strains.

Strain	Morphology	Oxidase	Production of acid from				NO <sub>3</sub> reduction	Urease
			glucose	xylose	mannose	lactose		
F1	Cocci	-	-	-	-	±	-	
F14	Cocci	-	-	-	-	+	-	
F50	Cocci	-	-	-	-	±	-	
B4	Coccobacilli	-	+	+	+	±	-	
J5	Cocci	-	-	-	-	±	-	
J16	Cocci	-	+	+	+	+	+	
J22	Cocci	-	+	+	+	+	+	
<i>A. radioresistens</i> FO-1	Cocobacilli	-	-	-	-	±	-	
<i>A. calcoaceticus</i> ATCC23055	Cocobacilli	-	+	+	+	+	+	
<i>M. osloensis</i> CCM5605	Cocci	+	-	-	-	±	+	

Table 2 DNA homology values and radiation-sensitivities of *Acinetobacter* strains.

Strain	G + C content (mol%)	DNA-DNA homology values(%) between		D <sub>10</sub> value (kGy)
		<i>A. radioresistens</i> FO-1	<i>A. calcoaceticus</i> ATCC23055	
F1	43.8	81	28	1.25
F14	42.1	71	40	0.60
F50	42.8	92	27	1.50
B4	44.3	77	34	0.80
J5	44.7	90	22	1.70
J16	41.1	37	93	0.35
J22	42.5	37	96	0.35
<i>A. radioresistens</i> FO-1	43.0	100	37	1.70
<i>A. calcoaceticus</i> ATCC23055	43.0	37	100	0.12
<i>M. osloensis</i> CCM5605	44.0	12	10	0.60

似たような値を示していた。DNAの相対値は *A. radioresistens* FO-1 株と比較して F1, F14, F50, B4, J5 株は 71 ~ 92% と高い値を示したのに対し, J16, J22, *A. calcoaceticus* ATCC23055 株は各 37% と比較的低い値を示した。また, *A. calcoaceticus* ATCC23055 株と比較しての相対値は J16 と J22 株が 93 または 96% と高い値を示したのに対し F1, F14, F50, B4, J5 および *A. radioresistens* FO-1 株は 22 ~ 40% と比較的低い値を示した。なお, *M. osloensis* CCM5605 株は両者に対し 10 ~ 12% と低い相対値を示した。

Rossau らは *Moraxellaceae* 科には *Moraxella* 属, *Acinetobacter* 属, *Psychrobacter* 属 (旧 *Moraxella-Acinetobacter*) があると DNA - rRNA 相対性および DNA - DNA 相対性の研究から分類しているが<sup>7)</sup>, 本研究の結果では分離株の全てが *Acinetobacter* 属に分類することができる。そして, F1, F14, F50, B4, J5 の各菌株は *A. radioresistens* FO-1 株と同じグループに属し, J16 と J22 株は *A. calcoaceticus* ATCC23055 株と同じグループに属することが明らかである。

*Acinetobacter* に分類された各分離株の 0.067M 燐酸緩衝液・溶存空気平衡下で照射して得られた生存曲線 (Fig. 1) から得られた D<sub>10</sub> 値は Table 2 に示すように F1, F14, F50, B4, J5 株では 0.60 ~ 1.70 kGy と高い抵抗性を示し, *A. radioresistens* FO-1 株の 1.70 kGy と似た値を示していた。一方, J16 と J22 株の D<sub>10</sub> 値は 0.35 kGy であり *A. calcoaceticus* ATCC23055 株の 0.12 kGy に近い値を示していた。

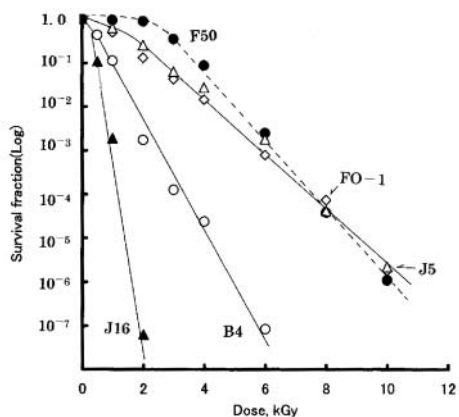


Fig. 1 Comparative sensitivities of several strains of *Acinetobacter* to gamma irradiation under air-equilibrium in phosphate buffer.

*M. osloensis* CCM5605 株の D<sub>10</sub> 値は 0.60 kGy であり放射線に比較的抵抗性が強かった。これらの結果は *Acinetobacter* に属す分離株には放射線抵抗性が強いグループと弱いグループがあり, DNA 相対性や分類学的性質と似た傾向を示している。

肉類や魚介類の腐敗性細菌として *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* 等と共に *Acinetobacter* が腐敗に関与することがある<sup>8)</sup>。しかし, *Acinetobacter* の多くは著者らが鶏肉の放射線殺菌効果の研究で報告<sup>8)</sup>したように放射線に対し抵抗性が弱い傾向を示していた。一方, 食品類からは MacConkey agar による大腸菌群検査で白

色コロニーが出現し、その多くが *Acinetobacter* であることが判明している。今回、骨粉などから分離された菌株は MacConkey agar 上に生えてきたものであり、放射線抵抗性株および感受性株が分離されたことにより、他の食品類にも放射線抵抗性 *Psychrobacter* と同様<sup>8)</sup>に放射線抵抗性 *Acinetobacter* が分布する可能性を示すものである。Nishimura らも *A. radioresistens* 類似株等を病院から分離しており、 $D_{10}$  値は 0.24 ~ 0.93 kGy に分布していたと報告している<sup>9)</sup>。放射線抵抗性細菌には *Deinococcus* 属に属する菌種や *Methylobacterium radiotolerans* (旧 *Pseudomonas radiora*) などが知られており、溶存空気平衡下での  $D_{10}$  値もそれぞれ 1.10 ~ 3.40 kGy または 0.54 ~ 2.20 kGy と報告されている<sup>10,11)</sup>、放射線抵抗性 *Acinetobacter* も同じような  $D_{10}$  値を有している。なお、DNA の相同値は同じ細菌の属内でも大きく異なることが報告されている<sup>7,12)</sup>。本研究の結果でも *Acinetobacter* と近縁種である *M. osoloensis* CCM5605 株では DNA 相同値が 10 ~ 12% と著しく低かったのに対し、*A. calcoaceticus* と *A. radiotolerans* の両グループ間では相同値が低いとしても 22 ~ 40% であり、同じ *Acinetobacter* 属に分類できることを示している。なお、同じグループに属す菌株間でも相同値が異なるのは各菌株の遺伝情報の差異によるものであろう。

#### まとめ

飼料原料の魚粉や羽毛粉、骨粉から 7 株の代表的な *Acinetobacter* が分離され、DNA の G + C 含量は 41 ~ 45% であった。F1, F14, F50, B4 および J5 株の分類学的性質は *A. radioresistens* FO-1 株と似ており、DNA 相同値も *A. radioresistens* FO-1 株と比べ 71 ~ 92% であった。一方、J16 と J22 株の分類学的性質は *A. calcoaceticus* ATCC23055 株と似ており、DNA の相同値も *A. radioresistens* FO-1 株と比べ *A. calcoaceticus* ATCC23055 株と J16, J22 株は各々 37% にすぎなかった。放射線感受性は抵抗性の強いグループと弱いグループに 2 分され、溶存空気平衡下での  $D_{10}$  値も F1, F14, F50, B4, J5 株は 0.60 ~ 1.70 kGy であり *A. radioresistens* FO-1 株の 1.70 kGy と似た値を示していた。一方、J16 と J22 株の  $D_{10}$  値は 0.35 kGy であり、*A. calcoaceticus* ATCC23055 株の 0.12 kGy に近い値を示した。

#### 文 献

- 1) 伊藤 均 ほか. 飼料用魚粉の微生物分布と放射線殺菌効果. *日本農芸化学会誌*, 57(1), p.9-16 (1983).
- 2) Kairiyama, E. et al. Radioresistance of an *Acinetobacter* species. *J. Appl. Microbiol.*, 25, p.401-406 (1979).
- 3) Krieg, N. R. et al. (Ed.) "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". London, Williams & Wilkins, Baltimore (1984).
- 4) 駒形和男(編). "微生物の化学的分類実験法". 学会出版センター (1993).
- 5) De, Lay, J. Reexamination of association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 101, p.738-754 (1990).
- 6) De, Lay, J. et al. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.*, 12, p.133-142 (1970).
- 7) Rossau, R. et al. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. Nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(2), p.316-319 (1991).
- 8) Prachasitthisak Y. et al. Shelf life extension of chicken meat by  $\gamma$ -irradiation and microflora changes. *Food Sci. Technol., Int.*, 2 (4), p.242-245 (1996).
- 9) Nishimura, Y. et al. Radiation sensitivities of *Acinetobacter* strains isolated from clinical sources. *Journal of Basic Microbiology*, 34 (5), p.242-245 (1996).
- 10) Ito H. et al. Isolation and identification of radiation-resistant cocci belonging to the genus *Deinococcus* from sewage sludges and animal feeds. *Agric. Biol. Chem.*, 47(6), p.1239-1247 (1983).
- 11) Ito H.; Iizuka H. Characterization of radiation-resistant species of *Pseudomonas radiora* and patterns of catalase activities. *Agric. Biol. Chem.*, 44(6), p.1315-1320 (1980).
- 12) 坂口健二. "遺伝子工学を考える". 日本放送出版協会 (1985).

(2008年6月2日受理)