

ルーメン中のデキストラン分解菌の 同定および糖の代謝経路

小崎道雄, 飯野久和, 五百蔵良*

Identification and sugar decomposed pathway on dextran attacking bacteria in bovine rumen

Michio KOZAKI, Hisakazu IINO and Ryo IOROI

Bovine rumen dextran which produce by *Streptococcus bovis* is caused to one of Tympanite disease, so dextran attacking bacteria in rumen are important to bovine health.

We isolated at first dextran attacking bacteria from rumen and morphological and physiological properties of isolates were study, especially hemine requirement and relation between volatile fatty acid and growth of isolated bacteria.

These dextran attacking bacteria were finally identified to 2 strains, This is, *Bacteroides ruminicola* subsp. *bovis* and *B. ruminicola* subsp. *ruminicola*, next, inner cell enzymes of *Bacteroides* which concerned to catabolism of sugar and estimated the pathway of sugar decomposition from dextran.

畜牛疾病の一つに鼓脹症があり、死廃頭数(約3万頭/1年)の25%をしめると言われる。¹⁾ 鼓脹症の原因は複雑で現在もなお不明な点が多いが、ルーメン常在乳酸菌 *Streptococcus bovis* の生産する dextran は、かねてから重要な原因の一つに挙げられている。通常ルーメン内の食餌の発酵により発生したガスは、嘔気となり排出されるが、たまたま dextran などの粘質物に包みこまれると、異状に蓄積し鼓脹症となる。その結果、乳量や体重が低下し重症の場合は窒息死する。

著者らはルーメン内乳酸菌を調査中に、強力に生デンプンを分解し^{2,3,4)}、glucoseより dextran を生産する^{5,6)} *Str. bovis* 148株を分離し amylase 生産菌として応用を試みていたが、逆にルーメン中では有害菌とみなされるようである。

したがって功罪両面をもつ *Str. bovis* の生産する dextran をルーメン中でよく分解し、鼓脹症を防ぐ有効菌の取得をまずこころみた。

ルーメンの dextran 分解菌は CLERKE⁷⁾ により *Lactobacillus bifidus* (現在は *Bifidobacterium bifidum*) のみが *Str. bovis* の生産する dextran を分解する唯一の菌種であると報告し、以後定説化されてきた。しかし数回にわたりルーメンの dextrin 分解菌を検討した結果は、常に *Bacteroides ruminicola* subsp. *ruminicola* および *B. ruminicola* subsp. *brevis* であり、*Bifidobac. bifidum* はほとんど検出されなかった。したがって、さらにその確認を目的としてルーメンの dextran 分解菌を分離同定し分離株の糖代謝系を検討して同定を確実なものとした。

* 青葉女子学園短期大学

実験方法

dextran分解菌分離の試料： 東京都立食肉センターで屠殺直後の牛ルーメン内容物を採取後、直ちに冷蔵し分離試料とした。

分離培地： 表1のDP培地を用いた。

分離方法： 0.9%食塩水で試料を数段階に分けて希釈し、ロールチューブ法により分離した。操作は全てCO₂ガス置換下である。分離株はさらにDP培地および除dextran培地に接種し、dextran分解能の有無を判定後供試菌とした。また分離株の単離にはルーメン内の生物共生を成立させる揮発脂肪酸（VFA）が因子となっているから、VFAを20mg / 100ml添加した。VFAの組成は等量のn-butyric acid, n-valeric acid, DL-2 methyl butyric acid および iso-valeric acidである。

グラム染色および細胞形態： 成書⁸⁾により常法にしたがった。

またルーメン細菌の同定には通常の細菌同定検査のほかに、オキシガル耐性、ヘミン要求性、糖発酵性、アミノ酸要求性などの検討が必要である。⁹⁾ これらの試験法は小崎⁸⁾ および岡田¹⁰⁾の方法を採用した。

VFA要求試験： *B.ruminicola*には亜種が置かれているため、ヘミン要求性以外にVFAの要求性およびペプチドとVFAとの関係をしらべた。供試培地には表1のDS培地からVFAを除去したものを基礎として、カザミノサン、カザミノサンVFA添加、VFAのみ、ポリペプトンのみ、ポリペプトンVFA添加、基礎培地の6種の培地を用いた。

調製したそれぞれの培地に、供試洗滌菌体の100倍希釈の懸濁液0.05mlを接種し、37℃、48時間培養後、濁度（680nm）を測定し、生育度として比較した。また同様の方法でVFA濃度と生育の関係もあわせてしらべた。

供試菌における糖代謝の検討

ルーメンから分離される主要なdextran分解菌の同定を確実にする目的で、菌体酵素とエネルギー代謝基質との関係をしらべた。供試菌は分離株のうち良好な生育をしめすRB-3株およびRB-6株を用いた。

菌体抽出液の調製： DP培地400mlに供試菌を接種しCO₂通気の嫌気下で37℃、12時間培養後遠沈集菌し0.05M acetate buffer (pH5.5) で洗滌を繰返した。つづいて0.06M phosphatebuffer (pH7.5) 25mlに懸濁し、超音波処理（20KHz, 15min.）により菌体破碎をおこない、遠沈後菌体抽出上澄液を得た。抽出液中のタンパク質量は卵アルブミンを標準物質として280nmの吸収波長測定により求めた。

菌体抽出液より酵素の検出および測定： 次の10種の酵素について検出をおこなった。

aldolase¹¹⁾, glyceraldehyde-3P dehydrogenase¹¹⁾, lactate dehydrogenase¹²⁾, isocitrate dehydrogenase¹²⁾, glutamate dehydrogenase¹²⁾, phosphoenol pyruvate¹¹⁾ carboxykinase, malate dehydrogenase¹²⁾, succinate dehydrogenase¹¹⁾, glutamate pyruvate transaminase¹²⁾, および glutamate oxaloacetate transaminase¹²⁾である。

それぞれの酵素の測定は、TAYLOR, BERGMEYERらによって記載された酵素分析法の成書にしたがって検出および測定をおこなった。

菌体抽出液の吸収波長測定： 供試菌2株の菌体抽出液を、それぞれ分光光度計（島津UV-240）をもちい、190～700nmの波長についてover scanした。

結果および考察

ルーメン汁1mlに対し10⁸～10⁹細胞のdextran分解菌が存在していたが、培地上の細胞集落は全て白色スムーズであった。これらより、数回の純化を繰返し代表株として、RB1, RB2, RB3,

Table 1 Media for *Bacteroides*

Constituents	Medium		
	DYP	DP	D.S
Dextran	1.0g	1.0g	1.0g
Yeast extract	1.0g		
Polypeptone	1.0g	0.5g	
CH ₃ COONa	200mg	200mg	200mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	200mg	200mg	200mg
NaHCO ₃	300mg	300mg	300mg
Cystein-HCL	50mg	50mg	50mg
Methionine			25mg
Mineral I ⁽¹⁾	15ml	15ml	15ml
Mineral II ⁽²⁾	15ml	15ml	15ml
Vitamin mix ⁽³⁾	0.1ml	0.1ml	0.1ml
Hemin	0.2mg	0.2mg	0.2mg
VFA solution	1ml	1ml	1ml

/100ml

(1) Mineral	1.5%	K ₂ HPO ₄	
(2) Mineral	1.5%	KH ₂ PO ₄	
	0.6%	NaCl	
	0.06%	MgSO ₄ ·7H ₂ O	
	0.06%	CaCl ₂ ·2H ₂ O	
(3) Vitamin mix	B ₁ -HCl		0.1
(mg/ml)	B ₂		0.1
	B ₆ -HCl		0.1
	Biotin		0.01
	Ca-dl-pantothenic acid		0.1
	Nicotinic acid		0.1
	P-amino benzoic acid		0.02
	Folic acid		0.001

RB5, RB6, RB9, RB11, RB12, RB13の9株を選択し以後の研究に使用した。

9株は全てグラム陰性, 0.8~1.0 μ m \times 2.0~3.0 μ mの大きさの短桿菌で, しばしばYまたはTのコリネ型形態が観察された。

また全株ともに耐酸素性, 耐熱性, 運動性, インドール産性, 硫化水素生成, 硝酸還元性, ガス発生およびcatalase産生はなく, ミルクの着色凝固, ヘミン要求性では僅かに菌株毎の差異が認められた。

糖の発酵性については, arabinose, cellobiose, などの5炭糖, glucose, galactose, などの全ての6炭糖, maltose, sucrose, raffinoseおよびxylan, starchなど多くの糖質を発酵するが, de-xtranにはとくに強力であった。しかし cellulose, CMCは利用できず, inulin, inositolは株によって相異がみられた。

発酵による主要な生産物はsuccinate, acetate, formateで, succinateがもっとも多く, 消費glucose 1mol 当り50%である。またRB1,

Table 2 Characteristics of dextran decomposing Bacteria isolated from Bovine rumen

item	Strains								
	RB1	RB2	RB3	RR5	RR6	RR9	RR11	RR12	RR13
gram stain	—	—	—	—	—	—	—	—	—
motility	—	—	—	—	—	—	—	—	—
sporulation	—	—	—	—	—	—	—	—	—
growth, aerobic	—	—	—	—	—	—	—	—	—
anaerobic CO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	—
N ₂	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2% bile		in hibit					in hibit		
production									
catalase	—	—	—	—	—	—	—	—	—
indole	—	—	—	—	—	—	—	—	—
gas	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H ₂ S	—	—	—	—	—	—	—	—	—
from glucose									
succinate		1 mol					1 mol		
acetate		0.26~0.30					0.28~0.33		
formate		0.04~0.06					0.04~0.06		
lactate		0.05~0.1					—		
nitrate reduction	—	—	—	—	—	—	—	—	—
gelatin digestion	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hemin requirment	—	—	—				essential		
NH ₄		essential					essential		
CO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VFA or peptide		essential or stimulate					essential or stimulate		

— negative + positive VFA... volatile fatty acid

RB2株は乳酸も検出された。

アミノ酸要求性に関しては共通してcysteinを必須とし、RB5, RB6, RB9, RB11, RB12およびRB13の6株はさらにmethionineを要求した。他のアミノ酸は全株ともに全く要求性がなかった。生育とpHについても、初発 pH 6.0~8.0ではよく生育するが、やゝアルカリ側に良好である。また30℃から45℃に生育する中温性菌であり、最適温度は40℃とやゝ中温性には高いが、50℃では全く生育は認められなかった。

これらの諸性質を表2にまとめたが、ルーメンよりdextran分解菌として取得した9株は、全株偏性嫌気性のグラム陰性無孢子短桿菌であった。これらの性質を有する細菌は、細菌分類の規範書とされるBERGEYの成書によるとBacteroidae科に該当し、本科には*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*などが置かれている。このうち*Fusobacterium*はglucoseからbutyrateを、また*Leptotrichia*はlactoseのみを生産する。しかし供試菌は、succinate,

acetate, formateおよびlactoseをglucoseより生成した。したがって供試の9株共に、明らかに*Bacteroides*に属する。

種に関しては、全株黒色々素を生産せず、消費糖に対して約50%のsuccinic acid, 10%のacetic acidを生成しmannose, arabinoseをよく発酵する。また2%胆汁で生育阻害を強くうけ、ヘミンを要求することから表2のようにRR株はともに*B. ruminicola* subsp. *ruminicola*と同定され、ヘミンを要求しないRB株は*B. ruminicola* subsp. *brevis*と同定された。

しかしヘミン要求性のみで*B. ruminicola*の亜種を分けるには、ヘミン要求性に強弱があり、不確定な結果があり、したがって、ルーメン細菌の多くが栄養素として要求するVFA, およびVFAの栄養はペプチド合成に関与することからペプチドとVFAとの関係をしらべた。

結果は表3のように合成培地のみではいずれの株も生育できない。またRB1, RB2, RB3株はカザミノサンおよびペプトンを添加しても効果はなく、VFAを加えてはじめて復活した。一方RR5以下の6株はカザミノサンのみでも僅かに増殖し、ポリペプトンではVFAと同等の生育を示した。このようにすべての供試菌にVFAは必須であったがRR株のグループの間にVFA要求性はポリペプトンにより代替されることから、ヘミン要求性で分類したRB株のグループとRR株のグループの間にVFA要求性にも相違があり、亜種としての分別のできる事がわかった。

またALLISON¹³⁾らはVFAがルーメン細菌に利用される場合、エネルギーではなく、アミノ酸の基本骨格に組み込まれることを明らかにしている。供試菌はいずれもVFAから菌体合成に必要なアミノ酸を生合成し、またポリペプトンがVFAの代替であることもわかった。

以上の結果より、明らかにRB株は*B.*

ruminicola subsp. *brevis*, RR株のグループは*B. ruminicola* subsp. *ruminicola*と同定し得た。

菌体内酵素の検出：

供試菌のdextranase活性や酵素学的考察をおこなうに先立ち、両亜種のエネルギー代謝をしらべて、代謝経路の解明をこころみ、同定結果をさらに確実とするため菌体内酵素をしらべた。

B. ruminicola subsp. *brevis*に属するなかで、最も生育良好なRB-3を供試した。まず破碎菌体より菌体内酵素のうち、糖代謝に関与する酵素について活性を測定した。aldolaseおよびglyceraldehyde-3P dehydrogenaseは明らかに保有し、後者はNADPで僅かに活性をしめすが、主にNAD関与でその活性比は10:1であった。

lactate dehydrogenaseはpyruvateを基質として明らかに乳酸を生成し、また isocitrate およびglutamateの両 dehydrogenase はともに検出されたが、NADHに特異的でNADPHでは活性は認められなかった。なお、これ以外の測定した酵素活性は極めて微弱であった。

また*B. ruminicola* subsp. *ruminicola*グループの代表株としてRR-6を供試した。BR-3と同様にaldolaseおよびglyceraldehyde-3P dehydrogenaseの活性は強く検出された。また後者はNAD関与であった。glutamate dehydrogenaseおよびmalate dehydrogenaseの存在も認められた。また、glutamate pyruvate transaminase, glutamate oxaloacetate transaminaseも共に強い活性が測定された。

しかしlactate dehydrogenase, isocitrate dihydrogenaseは検出されず、phosphoenol pyruvate carboxykinase, およびsuccinate dehydrogenaseの活性はきわめて微弱であった。

両亜種, *B. ruminicola* subsp. *brevis* RB-3および*B. ruminicola* subsp. *ruminicola* RR-6の菌体内酵素活性を表4にまとめた。

Table 3 Volatile Fatty Acid Requirement

	Strain No								
	RB1	RB2	RB3	RR5	RR6	RR9	RR11	RR12	RR13
Volatile Fatty Acid (VFA)	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Casamino acid	—	—	—	+	+	+	+	+	+
Casamino acid +VFA	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Polypeptone	—			+++	+++	+++	+++	+++	+++
Polypeptone +VFA	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
No added	—	—	—	—	—	—	—	—	—

+++ : O.D(680nm)Absorbance $\times 10^{-2} < 0.2$

++ : O.D $\times 10^{-2} \sim 0.1$

+ : O.D $\times 10^{-2} \sim 0.05$

± : O.D $\times 10^{-2} \sim 0.01$

Table 4 Enzyme Activity of *Bacteroides* cell

Enzyme	Co-Enzyme	Enzyme activity *1	
		B-3	R-6
Aldolase-G-3-P DH	NAD	5.32	4.12
	NADP	0.89	trace
Lactate dehydrogenase	NAD	9.98	— *2
	NADP	1.70	—
Isocitrate dehydrogenase	NAD	—	—
	NADP	1.70	—
Glutamate dehydrogenase	NAD	trace	65.63
	NADP	5.99	trace
PEP carboxykinase		trace	trace
Malate dehydrogenase	NAD	91.77	39.90
Succinate dehydrogenase		trace	trace
G.P. transaminase		trace	68.63
G.O. transaminase		trace	72.22

*1 A unit is absorbancy of 0.001 per min. at 340nm.

Results are as units per milligram of protein.

*2 No detect.

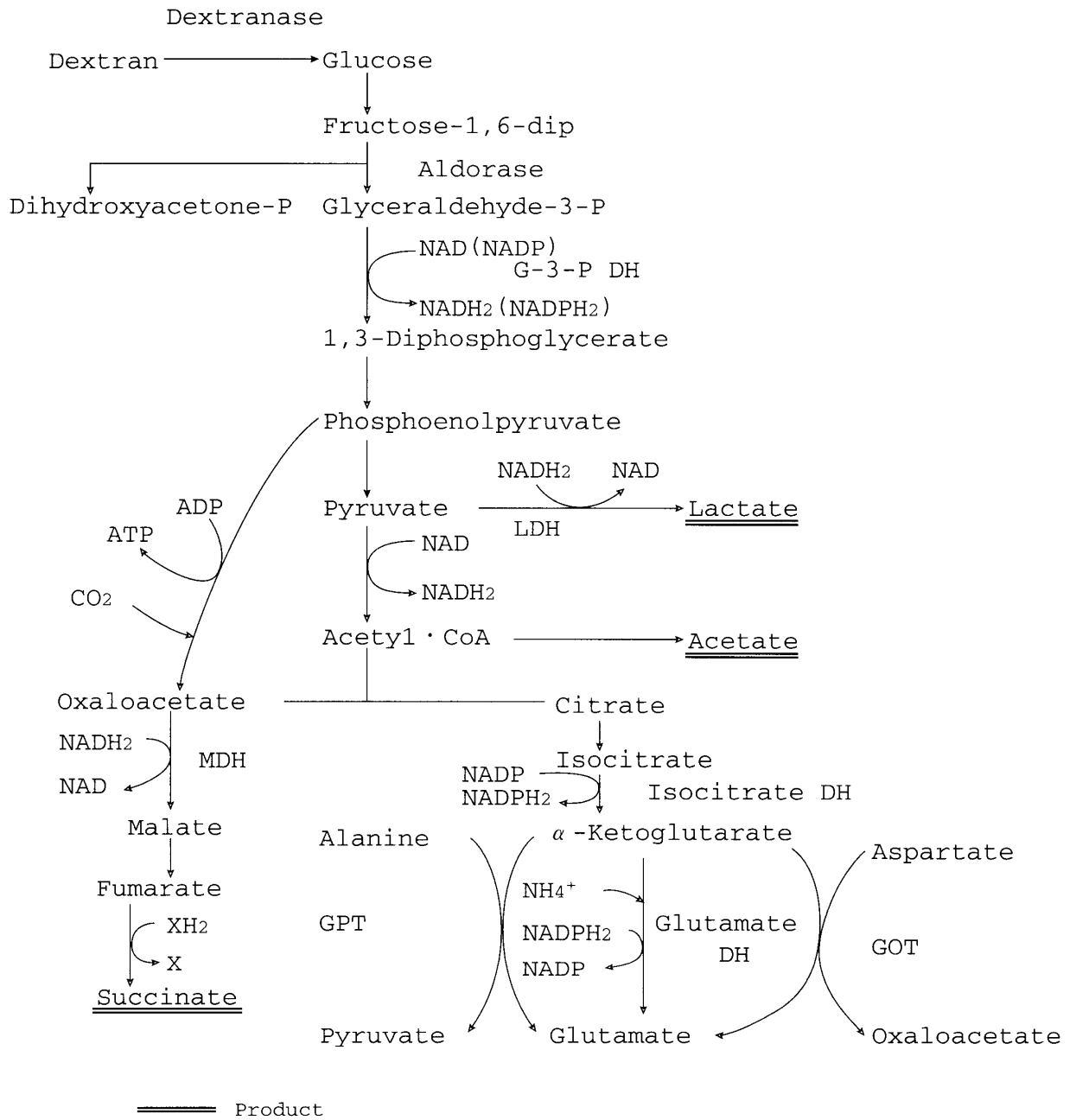


Fig.1. Estimated metabolic passway of *Bacteroides rumenicola*

以上のようにdextranを基質とした場合、*B. ruminicola*の2亜種はglucoseを経て、発酵生産物に主としてsuccinateおよびacetateを生成した。しかし、*B. ruminicola* subsp. *brevis*は乳酸も生産した。これら菌体内酵素活性の結果を総合的にまとめ、不完全ではあるが、糖分解代謝経路を図1のように推定した。すなわち糖の分解はglucoseからphosphoenol pyruvate, oxaloacetateを経てsuccinateに至る経路と、pyruvate acetyl CoAを経てacetateを生産する経路が主に考えられる。一方細胞合成とくにアミノ酸合成は α -ketoglutarateよりtransaminaseにより生合成されてゆくと推察された。

*Streptococcus bovis*などの生産するdextranが、畜牛膨脹症の一つの原因とみなされている。したがってルーメン中でdextranを分解する微生物の取得は重要である。その関与菌としてCLEA KEからは*Lactobacillus bifidus*が優力としていたが、数回にわたるルーメン中のdextran分解菌を探索した結果、*Bacteroides ruminicola*であることを知った。また詳細な細菌学的検討を加え、*B. ruminicola* subsp. *brevis*および*B. ruminicola* subsp. *ruminicola*であることも明確にした。

さらにこの同定結果をVFAの要求性とポリペプトンと関係で裏づけし、また細胞内酵素による糖代謝経路も想定して分類結果を確実にした。

文献

1. 坂内良二, 星野貞夫: 日本畜産会報, **52**, 118 (1981)
2. 溝上恭平, 小崎道雄, 北原覚雄: 日農化, **51**, 299 (1977)
3. 溝上恭平, 小崎道雄, 北原覚雄: 澱粉科学, **25**, 132 (1978)
4. 佐藤英一, 新村洋一, 内村泰, 小崎道雄: 農学集報 (東農大), **35**, 104 (1990)
5. HAYASHI T., KOZAKI M., : J. Gen. Appl. Microbiol., **26**, 245 (1980)
6. HAYASHI T., IOROI R., KOZAKI M., : J. Gen. Appl. Microbiol., **34**, 213 (1988)
7. CLERKE R.T. J : J.Gen. Microbiol., **20**, 549 (1959)
8. 小崎道雄監修: 乳酸菌実験マニュアル (1992) 朝倉書店
9. HOLDMAN L.V., CATO E.P. & MOORE W.E.C : Anaerobic lab. Manual 4th ed. (1977) Virginia polytech inc.
10. 乳酸菌研究集談会編: 乳酸菌の科学と技術, **19** (1996) (株)学会出版センター
11. J.F.TAYLOR : Method in Enzymology **1**, 310 (1955) Academic Press.
12. H.U.BERGMEYER & E.BERNT : Method of Enzymatic Analysis 2nd ; **2**, 624, 752, 727, 650 (1974) Verlag Chemie International.
13. ALLISON. M. J. M., KATZ J. & KEENEY M., J.Bacteriol. **83**, 1084 (1962)