

干物より分離した *Raoultella* 属細菌のヒスタミン産生特性の解明

北海道大学大学院水産科学研究院 助教 山木将悟

1. 背景と目的

ブリやマグロ、サバ、カツオ、イワシなどの赤身魚には多量の遊離ヒスチジンが含まれる。そのため、赤身魚がヒスタミン産生菌に汚染されていた場合、ヒスタミン産生菌のヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) が赤身魚の遊離ヒスチジンをヒスタミンへと変換する¹⁾。ヒスタミンが多量に蓄積した食品を喫食するとアレルギー様症状を呈するヒスタミン中毒が発生する。鮮魚に関連するヒスタミン産生菌は主にグラム陰性細菌である。我々は、腸内細菌科に属するヒスタミン産生菌 *Raoultella planticola* と *R. ornithinolytica* をサンマ開き干しから分離した。ヒスタミン産生菌として研究例の多い *Morganella morganii* と比較して、*R. planticola* と *R. ornithinolytica* のヒスタミン産生特性に関する知見は少ない。本研究では、これら2種のヒスタミン産生菌のヒスタミン産生特性について調べ、*R. planticola* と *R. ornithinolytica* のヒスタミン食中毒リスクについて明らかにすることを目的とした。

2. 試料および方法

2.1. 供試菌株

供試菌株として、サンマ開き干しより分離された *R. planticola* MFS 10041 と *R. ornithinolytica* MFS 10086 を使用した。また、比較対象として *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC 3848^T を使用した。各菌株は1% ヒスチジン添加 tryptic soy broth (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) (TSBH, pH7.0) で培養し、以降の実験に使用した。

2.2. 増殖特性とヒスタミン産生特性の分析

R. planticola MFS 10041, *R. ornithinolytica* MFS 10086, *M. morganii* NBRC 3848^T を 10^5 CFU/mL となるように TSBH (pH7.0) に接種し 4°C, 12°C, 25°C, 37°C で培養した。培養中、培養液を経時的に採取し生菌数とヒスタミン濃度を測定した。また、pH (5.0~8.0), NaCl 濃度 (0~5.0%) を調整した TSBH を使用し、同様に各菌株の生菌数の変化とヒスタミン濃度を測定した。さらに、嫌気培養時の増殖とヒスタミン産生能についても検討した。

2.3. *R. planticola* と *R. ornithinolytica* の HDC クラスタ解析

R. planticola MFS 10041, *R. ornithinolytica* MFS 10086 のゲノム DNA を抽出し、PacBio Sequel IIe を用いてシーケンシングを行った。Flye (ver. 2.9.1-b1780) でアセンブル後、各菌株の HDC クラスタを他のヒスタミン産生菌と比較し、その特徴について分析した。

3. 結果および考察

3.1. *R. planticola* MFS 10041 と *R. ornithinolytica* MFS 10086 の増殖とヒスタミン産生

増殖特性とヒスタミン産生特性を分析するため、温度、pH、塩分濃度を変更した種々の条件下で *R. planticola* MFS 10041 と *R. ornithinolytica* MFS 10086 を培養し生菌数とヒスタミン濃度の変化を調べた。*R. planticola* MFS 10041 と *R. ornithinolytica* MFS 10086 は各温度 (4°C~37°C) で増殖し、生菌数の増加に伴

いヒスタミンを産生した。一方、*M. morganii* は 4°C では増殖しなかった。どちらの *Raoultella* 属細菌も 4°C で増殖したことより、低温環境下でヒスタミンを蓄積する危険性が示唆された。また、25°C と 37°C において、*R. ornithinolytica* MFS 10086 の生菌数増加は他の 2 菌株に比べて極めて速く、水産物の品温上昇に伴い急速に生菌数が増加しヒスタミン蓄積リスクが高まることが示唆された。

培地の pH を 5.0~8.0 に調整した場合、*M. morganii* は pH5.0 で大きく増殖が遅延した。しかし、*R. ornithinolytica* と *R. planticola* は pH5.0 での増殖遅延がわずかであり、いずれも *M. morganii* に比べて優れた増殖を示した。pH5.0 と pH6.0 では、*R. ornithinolytica* と *R. planticola* のヒスタミン産生能が高まる傾向にあった。これは、*M. morganii* においても同様であった。NaCl 濃度を 0%~5.0%に調整した場合、*M. morganii* と *R. planticola* は 5.0%においても増殖しヒスタミンを産生したが、*R. ornithinolytica* は 5.0% NaCl 存在下での増殖とヒスタミン産生は見られなかった。嫌気培養時と好気培養時の増殖とヒスタミン産生を比較した結果、*M. morganii* と *R. planticola* は嫌気培養と好気培養における増殖とヒスタミン産生に差は認められなかったが、*R. ornithinolytica* では嫌気培養時に増殖とヒスタミン産生がわずかに遅延した。

3.2. *R. planticola* MFS 10041 と *R. ornithinolytica* MFS 10086 の HDC クラスタ

R. planticola MFS 10041 と *R. ornithinolytica* MFS 10086 の HDC クラスタは 4 つの遺伝子で構成されており、上流より histidine/histamine antiporter 1 (*hdcT1*), histidine decarboxylase (*hdc*), histidine/histamine antiporter 2 (*hdcT2*), histidine--tRNA ligase (*hisS*) が存在した。このクラスタ構造は *M. morganii* subsp. *morganii* DSM 30164^T (KC771251) と同様のものであった。さらに、*R. planticola* MFS 10041 と *R. ornithinolytica* MFS 10086 の HDC アミノ酸配列は 99.5%一致しており、*M. morganii* DSM 30164^T の HDC との一致率は両者とも 86.0%であった。したがって、*R. planticola* MFS 10041 と *R. ornithinolytica* MFS 10086 の HDC クラスタは *M. morganii* のものと類似しており、大きな機能的差異がないことが示唆された。

4. 総括

本研究では、過去にサンマ開き干しから分離した 2 種の *Raoultella* 属細菌の増殖特性とヒスタミン産生特性を明らかにするために研究を行った。*R. planticola* MFS 10041 と *R. ornithinolytica* MFS 10086 は 4°C の低温下で増殖可能であった。さらに、*R. ornithinolytica* MFS 10086 は中温での増殖が速く、本実験に供した 3 株の中で最もヒスタミン食中毒リスクが高いと考えられた。HDC クラスタ解析では、2 種の *Raoultella* 属細菌の HDC クラスタが既知の *M. morganii* のものに類似していることが明らかとなった。以上より、本研究では、これまであまり知られていなかった *R. planticola* と *R. ornithinolytica* のヒスタミン産生特性の一端を明らかとすることができた。今後は、より詳細な HDC の機能解析や遺伝子発現解析により、*Raoultella* 属細菌のヒスタミン産生機構に関する更なる理解が求められる。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 南北海道学術振興財団に厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

- 1) 山木将悟, 山崎浩司 (2019). 水産物におけるヒスタミン食中毒とヒスタミン生成菌. 日本食品微生物学会雑誌, 36, 75-83.