バクテリオファージによる *Raoultella* 属細菌の制御と食品のヒスタミン蓄積抑制
(若手研究者支援枠)

北海道大学大学院水産科学研究院 山木将悟

1. 背景と目的

ヒスタミン食中毒は、ヒスタミン産生菌によりヒスタミンが多量に蓄積した赤身魚が原因となる食中毒である。赤身魚のヒスタミン蓄積に関与するヒスタミン産生菌には、*Morganella morganii* や *Raoultella planticola*, *R. ornithinolytica*, *Photobacterium phosphoreum* 等が知られている。本研究では、細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージ（ファージ）を応用した *Raoultella* 属細菌の制御を目的とし、*Raoultella* 属細菌に感染するファージの性状を明らかにし、*Raoultella* ファージによる *Raoultella* 属細菌に対する増殖抑制能を評価した。

2. 試料および方法

2.1. 供試菌株と供試ファージ

供試菌株として、*R. planticola* NBRC 14939^T, *R. planticola* NBRC 3317, *R. planticola* MFS 10041, *R. ornithinolytica* ATCC 31898^T, *R. ornithinolytica* MFS 10086, *R. electrica* NBRC 109676^T を使用した。各菌株は Tryptic Soy Broth (TSB: BD, Franklin Lakes, NJ, USA) で培養し、以降の実験に使用した。また、食品または河川水を試料として、*R. planticola* または *R. ornithinolytica* に感染するファージを複数分離し、以降の実験に供した。

2.2. *Raoultella* ファージの宿主域と一般性状の分析

R. planticola NBRC 14939^T, *R. planticola* NBRC 3317, *R. planticola* MFS 10041 と、*R. ornithinolytica* ATCC 31898^T, *R. ornithinolytica* MFS 10086 を用いて宿主域の分析を行った。宿主域の分析はスポットテスト法により行った。また、一段増殖実験による感染動態の分析、透過型電子顕微鏡 (TEM) による形態観察により、*Raoultella* ファージの性状を分析した。

2.3. *Raoultella* ファージによる増殖抑制能の分析

液体培地と水煮マグロを使用して *Raoultella* ファージによる *R. planticola* と *R. ornithinolytica* の増殖抑制能を調べた。液体培地の試験では、約 2×10^5 CFU/mL となるように *R. planticola* NBRC 3317, *R. ornithinolytica* ATCC 31898, *R. electrica* NBRC 109676^T を TSB に接種し、RaoHU1 を約 2×10^7 PFU/mL となるように接種した。バイオフィトレコーダー (TN-1506, ADVANTEC, 東京, 日本) にて 37°C で振盪培養 (40 rpm) し、OD₆₆₀ を経時的に測定した。水煮マグロを用いた試験では、水煮マグロ 100 g に約 1×10^5 CFU/g となるように *R. ornithinolytica* MFS 10086 を接種し、約 1×10^8 PFU/g となるように RaoHU1 を接種した。4°C または 20°C で保存後、経時的に生菌数とヒスタミン濃度を測定した。

2.4. *Raoultella* ファージのゲノム解析

Raoultella ファージ RaoHU1, RaoHU6, RaoHU7 のゲノム解析を行った。各ファージのゲノムを抽出精製しライブラリ調製後、Novaseq X Plus にてシーケンスを行った。得られたデータから *de novo* アセンブリを行い、各ファージのゲノムを解析した。

3. 結果および考察

3.1. *Raoultella* ファージの宿主域と一般性状

当研究室で分離した *Raoultella* 属細菌に感染するファージのうち、宿主域の比較的広い RaoHU1, RaoHU6, RaoHU7 を選抜した。宿主域分析に使用した 5 株の *Raoultella* 属細菌のうち、RaoHU1 と RaoHU6 は 3 株に明瞭なプラークを形成し、RaoHU7 は 4 株に明瞭なプラークを形成した。TEM 観察の結果、RaoHU1 は頭部と収縮性の尾部からなるファージであった。また、一段増殖実験の結果、RaoHU1 の潜伏期、暗黒期、バーストサイズはそれぞれ 20 分間、10 分間、約 53 PFU/infected cell であると推定された。

3.2. *Raoultella* ファージによる *Raoultella* 属細菌の制御

液体培地と水煮マグロを使用して、RaoHU1 の *Raoultella* 属細菌に対する増殖抑制能を調べた。液体培地を用いた試験では、*R. planticola* NBRC 3317, *R. ornithinolytica* ATCC 31898^T, *R. electrica* NBRC 109676^T の増殖は RaoHU1 処理により大きく抑制された。すなわち、*R. planticola* NBRC 3317 では、RaoHU1 処理により OD₆₆₀ が増加するまでの時間を約 6 時間遅延できた。同様に、RaoHU1 処理は *R. ornithinolytica* ATCC 31898^T と *R. electrica* NBRC 109676^T の OD₆₆₀ の増加をそれぞれ約 6 時間、約 4 時間遅延した。水煮マグロを用いた試験では、4°C と 20°C のどちらの保存温度においても、RaoHU1 処理により *R. ornithinolytica* MFS 10086 の生菌数は大きく減少した。これに伴い、保存中の水煮マグロへのヒスタミン蓄積も大きく低減された。すなわち、ファージ接種のない対照区では、4°C、15 日間で 2000 mg/kg を超えるヒスタミン蓄積が確認できたが、RaoHU1 処理区では 4°C、15 日間の保存中にヒスタミンは検出されなかった。また、20°C、24 時間の保存では対照区のヒスタミン濃度は 3000 mg/kg を超えたが、RaoHU1 処理区ではヒスタミンは検出されなかった。したがって、*Raoultella* 属細菌による食品へのヒスタミン蓄積がファージ処理により低減できる可能性が示唆された。

3.3. *Raoultella* ファージのゲノム解析

RaoHU1, RaoHU6, RaoHU7 のゲノムシーケンスを行い、*de novo* アセンブリを行った結果、いずれのファージもゲノムサイズが約 170 kbp となった。Blastn により近縁のファージを調べた結果、*Straboviridae* 科に属する複数の *Klebsiella* ファージと *Raoultella* ファージがヒットし、RaoHU1, RaoHU6, RaoHU7 は *Straboviridae* 科に属する新規 *Raoultella* ファージであることが示唆された。

4. 総括

本研究では、ヒスタミン産生菌のひとつである *R. planticola* および *R. ornithinolytica* に感染するファージの性状分析と *Raoultella* 属細菌に対する増殖抑制能を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、分離したファージは *R. planticola* と *R. ornithinolytica* を含む複数の菌株に感染性を示した。特に、RaoHU1 は水煮マグロで *R. ornithinolytica* による増殖とヒスタミン蓄積を大きく低減した。したがって、*Raoultella* 属細菌によるヒスタミン蓄積の制御に、ファージの利用が有効である可能性が示唆された。今後、より詳細な実験によりファージの有効性を明らかにする予定である。

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。