

遺伝子工学技法により造成された  
L-セリン生産 *Escherichia coli* のフェージ

呉 偉 義

1990

遺伝子工学技法により造成された



①

## 遺伝子工学技法により造成された

### L-セリン生産 *Escherichia coli*

#### のファージ

1. 概要	1
2. 使用菌株	2
3. 試薬および装置	3
4. 培養および感染条件	4
5. 感染程度の評価	5
6. ファージおよび細菌の計数	6
7. ファージの精製	7
8. 電子顕微鏡試料の作製	8
9. 全ファージ血清の調製およびpH値の測定	9
10. ファージの吸着	10
11. ファージの増殖	11
12. ファージDNAの調製	12
13. ファージDNAの塩基組成	13
14. ファージDNAの熱安定性	14
15. アガロースゲル電気泳動	15
16. サインプロットハイブリダイゼーション	16
17. スリム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動	17
18. その他	18

呉 偉 巍

#### 第2章 ファージの一般的性状

1. 概説	19
2. プラーク形成	19

1990



序章	1
----	---

## 第 1 章 実験材料および実験方法…4

1. 使用ファージ	4
2. 使用細菌	4
3. 試薬および酵素	4
4. 培地および培養条件	6
5. 培養濁度の測定	6
6. ファージおよび細菌の計数	8
7. ファージの精製	8
8. 電子顕微鏡試料の作製	10
9. 抗ファージ血清の調製およびK価の測定	10
10. ファージの吸着	11
11. ファージの増殖	11
12. ファージDNAの調製	12
13. ファージDNAの塩基組成	12
14. ファージDNAの熱変性	12
15. アガロースゲル電気泳動	14
16. サザンブロットハイブリダイゼーション	14
17. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動	17
18. その他	18

## 第 2 章 ファージの一般的性状…19

1. 緒言	19
2. プラークの形態	19



3. ファージの宿主域	21
4. ファージ感染菌の溶菌	22
5. ファージの温度安定性	25
6. ファージの pH安定性	25
7. 小括	25

### 第3章 ファージの血清学的性質

1. 緒言	29
2. 抗ファージ血清とファージの交叉中和反応	29
3. 抗ファージ血清とその他のファージの中和反応	31
4. 小括	31

### 第4章 ファージの形態

1. 緒言	34
2. ファージの形態と大きさ	34
3. 考察	36
4. 小括	36

### 第5章 ファージの吸着および

#### 増殖

1. 緒言	39
2. ファージの吸着	39
3. ファージの吸着に及ぼす温度、金属およびアミノ酸の影響	39
4. ファージの増殖	44
5. ファージの増殖に及ぼす温度および pH の影響	44



6. 考察	48
7. 小括	51

## 第6章 ファージの核酸

1. 緒言	52
2. ファージの核酸	52
3. ファージDNAの塩基成分	53
4. ファージDNAの熱変性および塩基組成	53
5. ファージDNAの制限酵素による切断および大きさ	55
6. ファージゲノムの相同性の検討	61
7. 考察	61
8. 小括	63

## 第7章 ファージの蛋白質

1. 緒言	64
2. ファージの蛋白質	64
3. 小括	66

## 第8章 ファージに対するオルト

### フェニルフェノールの

### 作用

1. 緒言	67
2. 宿主菌に対するオルトフェニルフェノールの作用	67
3. ファージに対するオルトフェニルフェノールの作用	69
4. ファージの吸着に対するオルトフェニルフェノールの作用	69



5. ファージの増殖に対するオルトフェニルフェノールの作用	69
6. ファージ感染菌の溶菌に対するオルトフェニルフェノールの作用	74
7. 考察	76
8. 小括	77

## 第9章 その他のファージに対する オルトフェニルフェ ノールの作用

1. 緒言	78
2. 宿主菌に対するオルトフェニルフェノールの作用	78
3. ファージに対するオルトフェニルフェノールの作用	80
4. ファージの吸着に対するオルトフェニルフェノールの作用	84
5. ファージの増殖に対するオルトフェニルフェノールの作用	84
6. ファージ感染菌の溶菌に対するオルトフェニルフェノールの作用	89
7. オルトフェニルフェノールを用いる細胞内ファージの計数	96
8. 考察	96
9. 小括	100

## 第10章 温度と食塩による ファージの制御

1. 緒言	102
2. 宿主菌に対する温度の影響	102
3. ファージの増殖に対する温度の影響	104



4. 宿主菌に対する食塩の作用	106
5. ファージに対する食塩の作用	109
6. ファージの吸着に対する食塩の作用	109
7. ファージの増殖に対する食塩の作用	109
8. 食塩によるコロニー形成能喪失およびファージ増殖阻害に 対するベタインの影響	113
9. 温度と食塩の組合せによるファージ増殖の抑制	116
10. 考察	119
11. 小括	123
 終章	 125
1. 終論	125
2. 総括	126
 文献	 132
 謝 辞	 136



## 序章

細菌を侵すウイルスであるバクテリオファージ（以下、ファージと略）は、その発見以来かなりの期間、発酵と掛け離れた領域で研究されてきた。そして分子生物学を中心とする領域で、特に *Escherichia coli* のファージを研究素材として輝かしい成果が収められ、今日のバイオテクノロジーの基盤が築かれたことは周知の通りである。

細菌を利用する発酵工業では、莫大な数の細菌が連日のように培養されている。このことは、細菌を侵すファージに絶好の繁殖条件を提供していることになる。実際に、ほとんど全ての細菌利用発酵工業において、ファージ汚染による発酵生産の異常化が起こり、被害を受けることが判明して、ファージの研究は、発酵学の領域で重要なものとなり多数の研究が行われた（１，２）。今日、有用細菌のファージに関する報文は数百編以上に達しているが、基礎的な研究は少なく、その大多数は、ファージによる異常発酵の発生、ファージの分離およびファージの防除対策に関するものである（３）。

ファージの防除対策の一般的な方法は、異常の起こった発酵を治癒する方法がないために、次のような方法がとられる。すなわち、数の増えたファージを完全に不活化した後にその異常発酵培養液を廃棄する。また、工場内に充満したファージを加熱や化学薬品によって完全に不活化する。次いで、発生したファージに抵抗性の変異菌株を分離し、その菌株を使用して発酵を再開する。

これが一般的な方法であるが、これは、様々な問題点を有している。例えば、工場内のファージを完全に不活化することが難しいこ



と、発酵性能が原株と変わらないファージ抵抗性変異菌株が得られるとは限らないこと、ファージ抵抗性菌株を侵すファージの宿主域変異が起ること、宿主域変異が起らなくても別の種類のファージには侵されること、などである(3)。

この一般的な方法は、予防的な方法であって、ファージに侵された発酵を治癒する方法ではない。つまり、培養液におけるファージの作用を阻止する方法はないのが実情である。

発酵学領域において、ファージに関する研究は未だに重要な課題の一つであり、新しい観点からのファージ防御法の確立が待たれているのである。バイオテクノロジーの進展に伴って、遺伝子組み換え技法などで造成された細菌の工業的使用が拡大されること、発酵の連続化が拡大されることなどを考えると、ファージの防御に関する研究は、ますます重要となるのである。

直接発酵法や代謝中間体あるいは合成酵素基質からの変換法により、種々のアミノ酸が Corynebacterium や Brevibacterium などの細菌を利用して生産されている。生産菌は、自然界から分離された株および変異技術によって育成された変異株によるものが主であった。しかし、最近では、組換えDNA技法によって造成された Escherichia coli を使用するアミノ酸生産が行われるようになっていく。更に、アミノ酸以外の諸有用物質の生産も行われるようになっていく。

セルフクローニングにより、L-セリンの生産能を増強した Escherichia coli を使用しているM社O工場において、この菌株の培養中に2回溶菌現象が発生した(1985年, 1986年)。

著者は、この溶菌液から溶菌現象の原因として2種類のファージ



を分離し、S 1 および S 2 ファージと命名した。これを契機として、アミノ酸生産を初めとして、その他の有用物質生産においても多大の被害を与え、それらの発酵を不安定にする原因となっているファージの防御を目的として、その一つのモデルとして、この遺伝子組換え技法によって造成された Escherichia coli の S 1 および S 2 ファージを取り上げ、研究することにした。

本論文は、L-セリン生産 Escherichia coli の溶菌液から新たに分離した S 1 および S 2 ファージの諸性状について研究し、これらのファージが Escherichia coli の既報のファージと違う、新しいファージであることを明らかにするとともに、更に、新しい観点からファージの防御に関して研究した次第と結果をまとめたものである。



## 第 1 章 実験材料および実験方法

### 1. 使用ファージ

ファージは、L-セリン生産 Escherichia coli K-12の溶菌液から新しく分離した S 1 および S 2 ファージを使用した。

一部の実験では、Escherichia coliのその他のファージを使用した(4)。Table 1 に、使用した14種のファージの核酸型、形態、宿主菌株をまとめて示す。更に、Bacillus subtilis YのM 2、S P O 1 ファージおよび Lactobacillus casei S 1 のJ 1 ファージも使用した。

### 2. 使用細菌

S 1 および S 2 ファージの宿主菌として、Escherichia coli K-12を使用した。その他のファージの宿主菌株は、Table 1に表示した通りである。また、一部の実験において、Escherichia coliのその他の10株および Escherichia coli以外の14属62種105株の細菌を使用した。

### 3. 試薬および酵素

アミノ酸は、宝興産(株)の製品を使用した。ポリエチレングリコール6000は、片山化学(株)の製品を使用した。ウラニル酢酸は、三津和化学(株)の製品を使用した。オルトフェニルフェノールは、東京化成工業(株)の o-フェニルフェノールナトリウムを使用した。ベタインは、和光純薬工業(株)の塩酸ベタインを使用した。S D S-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用マーカーの標準蛋白質は、



Table 1. List of Escherichia coli phages used

Phage	Nucleic acid	Morphology <sup>a</sup>	Host strain
T2, T4, T6		A	B
$\lambda$	Double-stranded DNA	B	K-12
T1, T5			B
T3, T7		C	B
$\phi$ X174	Single-stranded DNA	D	C
$\delta$ A		E	K-12 W3110 F <sup>+</sup>
MS2, Q $\beta$ , GA, SP	Single-stranded RNA	F	K-12 W3110 F <sup>+</sup>

<sup>a</sup> A, contractile tail; B, long tail, non-contractile; C, short tail; D, tailless, large capsomers; E, filamentous; F, tailless, small capsomers.



LKB-Produker AB の製品を使用した。サザンブロットハイブリダイゼーション用の試薬キットは、Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany) の製品を使用した。その他の試薬は、和光純薬工業(株)の製品を使用した。

酵素は、Table 2 に あげた40種類の制限酵素を使用した。社名は表示の通りである。λ DNA は、東洋紡 (株) の製品を使用した。

#### 4. 培地および培養条件

ファージおよび細菌の培養には、通常のブイヨン培地を使用した。その組成は、ポリペプトン (大五栄養化学 [株]) 10g, 肉エキス (極東製薬工業 [株]) 10g, NaCl 5g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g, 純水1000mlである。pHは、7.0である。

Lactobacillus casei の培養には、MRT培地 (pH 6.0)(5)を使用した。

培養に際しては、斜面培養の1白金耳量を液体培地に接種し、モノ振盪培養装置を使用して、約15時間振盪培養した。更に、新しい液体培地に5%接種し、3~4時間振盪培養し、培養液の660 nmにおける吸光度が約 0.4に達したものを対数増殖期の菌細胞として使用した。Lactobacillus casei の場合は、1白金耳量を接種し、振盪せず静置培養した。培養温度は、いずれも37℃である。

#### 5. 培養濁度の測定

培養液の濁度は、光電比色計 (島津-Bausch-Lomb、スペクトロニック 20)を用いて、660nmの吸光度を測定した。ブランクは、未



Table 2. List of restriction endonucleases used

Enzyme	Obtained from	Enzyme	Obtained from
<u>Acc</u> I	Nippon gene Co.	<u>Pvu</u> II	Nippon gene Co.
<u>Afl</u> II	Takara shuzo Co.	<u>Mlu</u> I	Nippon gene Co.
<u>Apa</u> I	Nippon gene Co.	<u>Mro</u> I	Toyobo Co.
<u>Ava</u> I	Nippon gene Co.	<u>Nar</u> I	Nippon gene Co.
<u>Axy</u> I	Nippon gene Co.	<u>Nde</u> I	Nippon gene Co.
<u>Bgl</u> I	Nippon gene Co.	<u>Nco</u> I	Nippon gene Co.
<u>Bgl</u> II	Nippon gene Co.	<u>Not</u> I	Nippon gene Co.
<u>BstE</u> II	Nippon gene Co.	<u>Nsp</u> V	Nippon gene Co.
<u>BamH</u> I	Nippon gene Co.	<u>Nhe</u> I	Nippon gene Co.
<u>Dra</u> I	Nippon gene Co.	<u>Rsa</u> I	Nippon gene Co.
<u>EcoR</u> I	Nippon gene Co.	<u>Sma</u> I	Toyobo Co.
<u>Eco</u> 0109 I	Nippon gene Co.	<u>Sal</u> I	Toyobo Co.
<u>EcoR</u> V	Nippon gene Co.	<u>Sau3A</u> I	Nippon gene Co.
<u>Hinc</u> II	Toyobo Co.	<u>Stu</u> I	Takara shuzo Co.
<u>Hind</u> III	Takara shuzo Co.	<u>Sca</u> I	Nippon gene Co.
<u>Hae</u> II	Toyobo Co.	<u>Sac</u> I	Nippon gene Co.
<u>Hae</u> III	Toyobo Co.	<u>Sac</u> II	Nippon gene Co.
<u>Hap</u> I	Nippon gene Co.	<u>Ssp</u> I	Nippon gene Co.
<u>Kpn</u> I	Takara shuzo Co.	<u>Xba</u> I	Nippon gene Co.
<u>Pst</u> I	Takara shuzo Co.	<u>Xho</u> I	Nippon gene Co.



接種の培地を使用した。

#### 6. ファージおよび細菌の計数

ファージの計数は、重層法によるプラークカウント法によった。  
(6). 細菌の計数は、重層法によるコロニーカウント法によった。

Lactobacillus caseiの場合、Lactobacillusに適するように改変された、重層法によるプラークカウント法およびコロニーカウント法(5)によった。

なお、ファージおよび細菌の希釈には、次の組成の希釈液を使用した。すなわち、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.35g、 $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.56g、 $\text{NaCl}$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g、ゼラチン 0.03g、純水1000ml、pH 7.0である。

#### 7. ファージの精製

ファージ溶菌液 ( $10^{10-11}$  PFU/ml) から Fig. 1 に示すように、超遠心分離機を使用する物理的な方法 (7) でファージを精製した。すなわち、溶菌液中の菌体残渣を低速遠心によって沈殿除去し、高速遠心によってファージを沈降させる分画遠心分離を繰り返してファージを精製した。最終的に得られたファージペレットは、0.02M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、精製ファージ液とした ( $1-2 \times 10^{12}$  PFU/ml)。

高速遠心分離は、分離用超遠心機 (日立、55-P72) を使用して行った。

---

PFU: Plaque Forming Unit







#### 8. 電子顕微鏡試料の作製

電子顕微鏡試料の作製は、ウラニル酢酸を使用するネガティブ染色法(8)によった。すなわち、1) 電子顕微鏡用シートメッシュ(応研商時事〔株〕)に湿式法(9)でコロジオ膜を張り、乾燥させた。2) 精製ファージ液を0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)で、 $1 \times 10^{10}$  PFU/mlになるように希釈した。3) 希釈したファージ液の1滴をコロジオ膜上に載せ、乾燥させた。4) ウラニル酢酸(1%、pH 5.0)の1滴をこの上に加えて、2~3分間染色し、乾燥させた。

電子顕微鏡は、日本電子(株)のJEM-100Bを使用した。

#### 9. 抗ファージ血清の調製およびK価の測定

抗ファージ血清は、次のようにして調製した。1) 体重約2Kgの家ウサギに精製ファージ液( $1 \times 10^{11}$  PFU/ml)を皮下注射した。注射は、1回に1~5ml、1週間に2回、次第に量を増しながら5週間にわたって続けた。2) 最後の注射をしてから1週間後に、ウサギの耳翼動脈から試採血してK価を測定し、十分な抗体価に達していることを確かめてから全採血した。3) 全採血は、ウサギの頸部を開き、頸部動脈から行った。血液は、試験管に取り、斜面にして凝固させた。次いで、37℃に60分間保った後、血餅を管壁から剥がし、直立させて4℃で一夜静置し、分離した血清を取った。4) K価は、次のようにして測定した。すなわち、培地で抗ファージ血清を希釈して2倍連続希釈列を作り、各希釈液の0.5mlにファージ液( $4 \times 10^7$  PFU/ml)の0.5mlを混和し、37℃で5分間反応させた。この反応液の一部を取り、氷冷した培地で1000倍に希釈し、残存するファージを計数した。対照としては、抗血清希釈液の代わりに培地を使用した。



90~99%のファージが中和される範囲で次式によってK値を計算した。

$$K = 2.3 D / t \times \log p / P$$

D : 反応液中の抗ファージ血清の希釈倍率

t : 反応時間 (分)

p : 反応前のファージ数

P : t 分後の残存ファージ数

#### 10. ファージの吸着

宿主菌 ( $2 \times 10^8$  cells/ml) にファージを m.o.i. 約 1 になるように混和し、37℃で所定の時間吸着させた。次いで、氷冷した希釈液 (組成は上述) で100倍希釈し、遠心分離 (8000 rpm、15分)、上澄みの未吸着ファージを計数して、ファージの吸着率を求めた。また、一部の実験では、0.02M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄した菌を用いて、上記のようにしてファージの吸着率を測定した。

#### 11. ファージの増殖

一段階増殖実験法で行った。すなわち、宿主菌 ( $2 \times 10^8$  cells/ml) にファージを m.o.i. 約 0.1 になるように混和し、37℃で3分間吸着させた。次いで、抗ファージ血清を混和し、2分間中和反応を行った後、その一部をブイヨン培地に取り、感染菌数が約  $2 \times 10^3$  cells/ml になるようにした。これを37℃で培養し、経時的に感染中心数 (感染菌 + 遊離ファージ数) を計数した。

他方、細胞内におけるファージの増殖を知るために、次の方法で細胞内のファージを計数した。すなわち、一段階増殖実験管から経



時的に1.9mlを取り、0.1mlのクロロホルムを混和して、37℃で10分間作用し、溶菌させた。

#### 12. ファージDNAの調製

Fig. 2 に示すように、ポリエチレングリコール6000でファージを濃縮し、フェノール法(10)でファージDNAを調製した。

#### 13. ファージDNAの塩基組成

ファージDNAをWyatt(11)の方法に従って酸分解した。すなわち、約0.5mgのDNAを硬質ガラス管(10×100mm)に取り、0.5mlの98~100%蟻酸を加えて減圧封管し、油溶中で175℃、30分間加熱した。冷えてから開管し、減圧下で蒸発乾固し、N-塩酸を0.1ml加えて水解物をよく溶解させた。マイクロピペットで数回に分けて試料0.01mlを濾紙(東洋濾紙 No.51)にスポットした。スタンダードとして5つの塩基(グアニン、アデニン、シトシン、ウラシル、チミン)をスポットした。溶媒は、Wyatt(11)のイソプロパノール-塩酸(65mlのイソプロパノールに濃塩酸を加え、純水で100mlにする。塩酸の終濃度は2N)を使用した。展開は上昇法で行った。濾紙上のスポット塩基の検出は、Ultra-violet Products のトランスイルミネータ(TS-15)で行った。

#### 14. ファージDNAの熱変性

MarmurとDoty(12)およびDotyら(13)の方法によって、ファージDNAの熱変性温度( $T_m$ )を測定した。すなわち、精製した



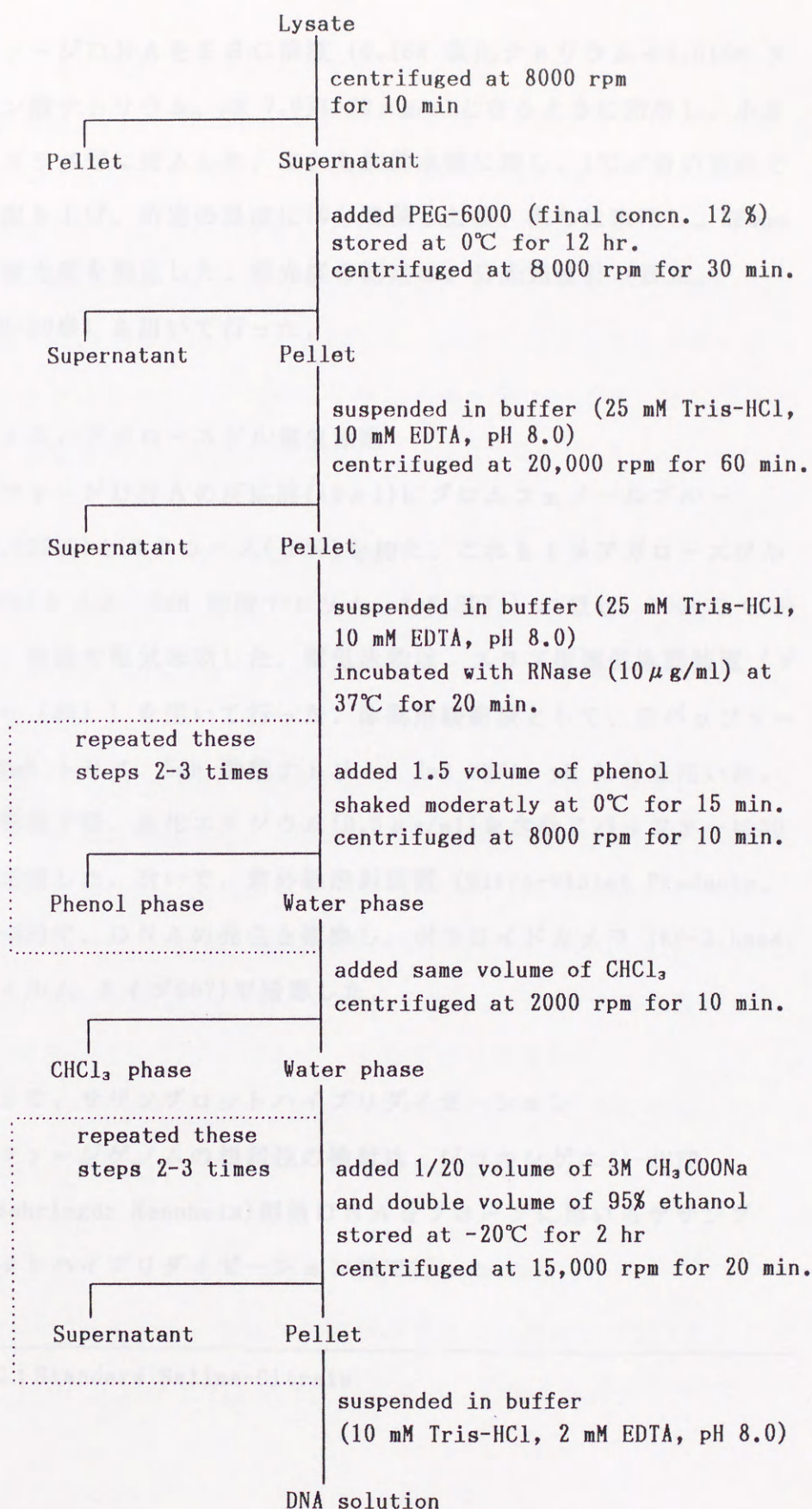


Fig. 2. Preparation of S-phage DNA.



ファージDNAをSSC溶液(0.15M 塩化ナトリウム+0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)に20  $\mu$ g/mlとなるように溶解し、小さいガラス管に封入した。これを加熱水槽に浸し、1℃/分の割合で温度を上げ、所定の温度に10分間保った後、直ちに氷冷し、260nmの吸光度を測定した。吸光度の測定は、分光光度計(日立、100-30形)を用いて行った。

#### 15. アガロースゲル電気泳動

ファージDNAの反応液(10  $\mu$ l)にブロムフェノールブルー(0.025%)とスクロース(8%)を加え、これを1%アガロースゲル(40mMトリス、5mM 酢酸ナトリウム、2mM EDTA)に載せ、100Vで60分間、室温で電気泳動した。電気泳動は、スラブ型電気泳動装置(アトー〔株〕)を用いて行った。泳動用緩衝液として、Eバッファー(40mM トリス、5mM 酢酸ナトリウム、2mM EDTA、pH 8.0)を用いた。泳動終了後、臭化エチジウム(0.5  $\mu$ g/ml)を含むEバッファーに30分間浸した。次いで、紫外線照射装置(Ultra-violet Products、TL-33)で、DNAの発色を観察し、ポラロイドカメラ(MP-3 Land、フィルム タイプ667)で撮影した。

#### 16. サザンブロットハイブリダイゼーション

ファージゲノムの相同性の検討は、ジゴキシゲニン-dUTP(Boehringer Mannheim)標識DNAをプローブに用いるサザンブロットハイブリダイゼーション法で行った。

---

SSC: Standard Saline-Citrate



#### A. サザントランスファー

制限酵素 Acc I で消化した DNA 断片は、1 % アガロースゲル電気泳動で分離させた後、ゲルを 0.5M NaOH-1.5M NaCl でアルカリ処理することによって 1 本鎖にした。アガロースゲルを、0.5M Tris-HCl-1.5M NaCl (pH 7.5) で中和した後、ニトロセルロース膜に 1 本鎖 DNA のトランスファーを行った。DNA のニトロセルロースへのトランスファー、いわゆるサザンブロッティングは、Fig. 3 に示す装置を用い、湿式自然上昇法で行った (14)。

#### B. プロブ DNA の標識

プロブ DNA の標識は、Boehringer Mannheim の非放射性 DNA labeling and Detection kit を用いて、次のように行った (15)。

1) DNA 変性 制限酵素で処理した DNA をフェノール-クロロフォルムで抽出後、エタノールで沈殿させた。この DNA 溶液を 95℃ で 10 分間、加熱処理し、氷-エタノールに入れ急冷した。

2) DNA 標識 変性直後の DNA 溶液に Hexanucleotide 混合液、dUTP 標識液、Klenow enzyme を加え、37℃ で 1 時間反応させ、200mM EDTA (pH 8.0) を加えて、反応を停止させた。

3) DNA の回収 標識 DNA は、エタノール沈殿後、TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) に溶解した。

#### C. DNA-DNA ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションおよび検出は、次のように行った。

1) プレハイブリダイゼーション DNA を結合させニトロ



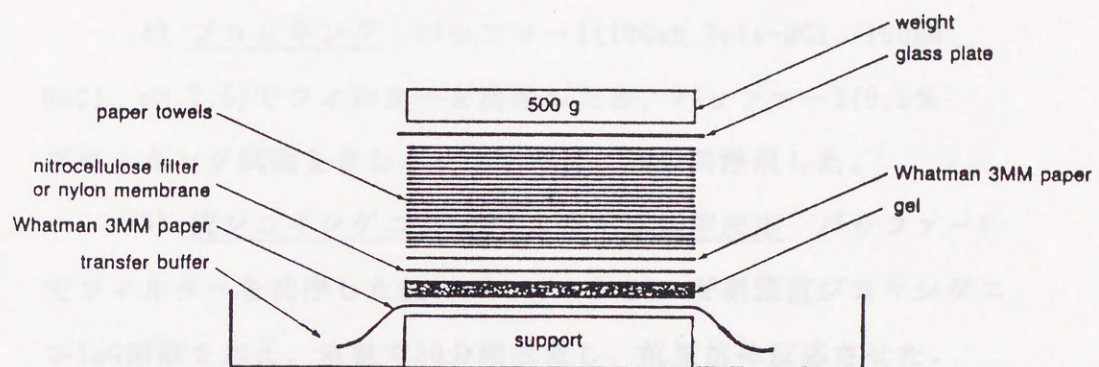


Fig. 3. Apparatus for southern blotting.



セルロースフィルターをハイブリダイゼーション溶液 (5×SSC、5% ブロッキング試薬、0.1% N-Lauroylsarcosine、0.02% SDS、50% formamide)の中で、42℃1時間加温した。

2) ハイブリダイゼーション 熱変性直後に標識したプローブDNA溶液をDNAを結合させたニトロセルロースフィルターに加え、ハイブリダイゼーション液中で42℃3時間加温した。

3) 反応停止 2×SSC-1% SDS、次いで0.1×SSC-0.1% SDSでフィルターを洗浄した。

4) ブロッキング バッファー1(100mM Tris-HCl、150mM NaCl、pH 7.5)でフィルターを洗浄した後、バッファー2(0.5% ブロッキング試薬を含むバッファー1)に30分間浸漬した。

5) 抗ジコキシゲニンIgGによる抗原抗体反応 バッファー1でフィルターを洗浄した後、パーオキシダーゼ標識抗ジコキシゲニンIgG溶液を加え、室温で30分間放置し、抗原抗体反応させた。

6) パーオキシダーゼ発色によるDNA-DNAハイブリダイゼーションの検定 バッファー1でフィルターを洗浄し、バッファー3(100mM Tris-HCl、100mM NaCl、50mM MgCl<sub>2</sub>、pH 9.5)で平衡化した後、発色試薬溶液(NBT-solution、X-phosphat solution)を加え、室温で18時間反応させた。

#### 17. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

精製したファージを0.3mlのトリス-塩酸緩衝液 (0.0625 M トリス-塩酸、pH 6.8、2% SDS、10% グルセロール、5% 2-メルカプトエタノールを含む) に懸濁した ( $2 \times 10^{10}$  PFU/ml)。これを100℃

---

NBT: 4-Nitrobluetetrazolium chloride



の熱湯に10分間漬けて、ファージを分解させた。次いで、約 $10\mu\text{l}$ の分解液をゲル（10%アクリルアミド）に載せ、50Vで3~4時間、室温で電気泳動した。泳動槽は、スラブ泳動槽（バイオラッド〔株〕）を用いた。泳動用緩衝液として、0.025 M トリス-0.192M グリシン-0.1% SDS (pH 8.3) 混液を用いた。

標準蛋白質として、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用マーカー（分子量 14,000のリゾチム、31,000のボビンカーボニクアンハイドレイス、42,700の卵白アルブミン、66,200の牛血清アルブミン、97,000のホスホリラゼ、116,000の $\beta$ -ガラクトシダーゼ）を用いた。泳動マーカーとしては、0.01%ブロムフェノールブルーを用いた。泳動終了後、ゲルを取り出し、5%トリクロロ酢酸溶液で一夜固定し、1%クーマシーブリリアントブルー（5%トリクロロ酢酸に溶解させたもの）で37℃3時間染色し、7%酢酸水溶液に浸し、脱色した（16）。

#### 18. その他

細菌に関するその他の実験方法および生化学的実験方法は、常法の方法によった。ファージに関するその他の実験方法は、Adams(6)がまとめて記載した標準法によった。



## 第2章 ファージの一般的性状

### 1. 緒言

まず、ファージの分離について述べる。セルフクロニングによりL-セリンの生産能を増強した *Escherichia coli* K-12を使用しているM社O工場において、この菌株の培養中に溶菌現象が発生した(1985年)。この培養溶菌液を希釈してプレートしたところ、多くのプラークの生成が認められ、この溶菌現象がファージに原因することが明らかとなった。このファージに対して、Serine生産菌の最初のファージにちなんでS1と命名した。

ファージが発生したときの常法にしたがって、S1ファージに抵抗性の変異菌株が分離され、工場においては、それ以後この菌株が使用された。およそ1年後に再び溶菌現象が発生した(1986年)。この溶菌液からもファージを分離し、Serine生産菌の2回目のファージにちなんでS2と命名した。

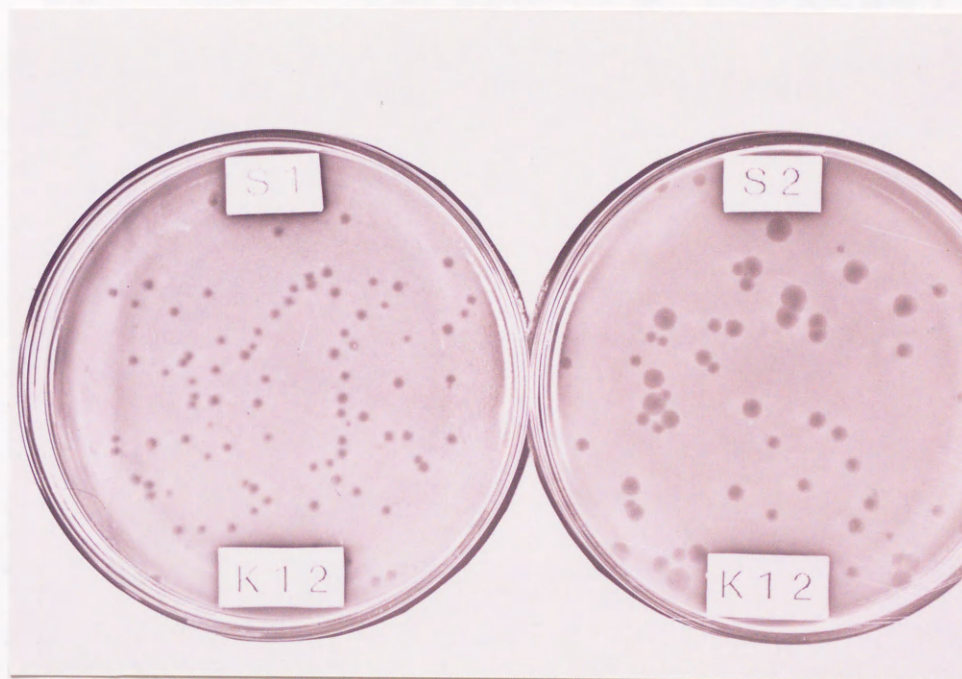
本章では、S1およびS2ファージの一般的な性状について検討した。目的の一つは、この2種類のファージの相違を知ることである。

### 2. プラークの形態

一個のファージは、一個のプラークを形成する。一般的に、ファージの種類によってプラークの形態が違うので、プラークを比較観察することは、ファージの相違を知る目安になる。

S1およびS2ファージのプラークの形態を Fig. 4 に示す。





[ 2 c m ]

Fig. 4. Plaques of S-phages.



S 1 ファージのプラークは、直径約 1~1.5 mm、透明で周辺のはっきりした円形であった。既報の Escherichia coli のファージのプラークでは、 $\lambda$  ファージのそれに類似している。

S 2 ファージのプラークは、直径約 4~6 mm、その中央に透明な溶菌部を有する円形であった。すなわち、T 3 ファージのプラークに類似している。

このように、S 1 と S 2 ファージのプラークは、形態および大きさが違うことが分かった。

### 3. ファージの宿主域

ファージは、一般に菌株特異性をもっていて、細菌の種のなかのある特定の菌株しか侵さない。しかし、あるファージは、広い範囲の細菌を侵し、その範囲が細菌分類の属を越えることすらある。宿主域、すなわちファージの侵し得る菌株の幅は、類似した性質をもつファージを分ける特性でもある。

S 1 および S 2 ファージの宿主域について、Arthrobater (4種、6株)、Bacillus (2種、8株)、Brevibacterium (25種、49株)、Corynebacterium (12種、18株)、Escherichia coli (14株)、Klebsiella pneumoniae (1株)、Lactobacillus (2種、3株)、Microbacterium (4種、7株)、Micrococcus (5種、6株)、Proteus (2種、2株)、Pseudomonas phaseolicola (1株)、Salmonella typhimurium (1株)、Sarcina lutea (1株)、Serratia marcescens (1株)、Staphylococcus aureus (1株) を用いて検討した。この15属、63種、119株のなかで、S 1 および S 2 ファージは、Escherichia coli に対して高い種特異性を示した。



次いで、*Escherichia coli*の 14 株を用いて株特異性について検討した。Table 3 にその結果を示す。S 1 ファージは 7 株、S 2 ファージは 8 株を宿主とすること、うち 5 株は両ファージ共通の宿主となり得ること、宿主域が違ふことからこの 2 種類のファージは違ふことが分かった。また、 $\lambda$  ファージをプロファージとして有している菌株を宿主とし得ることから、S 1 および S 2 ファージは、 $\lambda$  ファージと違ふ種類のファージであることが分かった。

K-12を1としたときのプレート効率 (EOP) も合わせ表示しているが、両ファージ共通してK-12 W3101 ( $\lambda$ )で0.2~0.25であり、S 2 ファージの場合、Cで0.75、BとK-12 W3623で $10^{-6}$ のオーダーであった。なお、K-12 MTにおいて、プラスミドの有無がEOPに影響を及ぼさないことから、両ファージのゲノムとこのプラスミドは関係がないと考えられる。

#### 4. ファージ感染菌の溶菌

細菌培養液にファージを加えると、ファージが細菌に感染し、一定時間後に溶菌して一定数のファージを放出する。放出されたファージは、再び感染を起こし、同様な過程が繰り返されることによって、細菌培養液は、ついに透明になる。

ファージ感染菌の溶菌の特性は、菌・ファージ系によって違い、同一系においても加えたファージの数によって異なる。

この溶菌の特性をS系ファージ感染菌について検討した。Fig. 5 にその結果を示す。S 1 ファージ感染菌では、約30分から緩やかな溶菌が始まったが、S 2 ファージ感染菌では、約15分から急激な溶菌が起って培養液はほとんど透明になった。溶菌開始時間は、後述



Table 3. Host specificity of S-phages on strains of Escherichia coli

Strain	S1		S2	
	PFU/ml	EOP	PFU/ml	EOP
A745	0	-	0	-
B	0	-	$2 \times 10^3$	$1 \times 10^{-6}$
C	0	-	$1.5 \times 10^{10}$	0.75
C600	$1 \times 10^{11}$	1	0	-
K-12	$1 \times 10^{11}$	1	$2 \times 10^{10}$	1
K-12 ( $\lambda$ )	$1 \times 10^{11}$	1	$2 \times 10^{10}$	1
K-12 MT	$1 \times 10^{11}$	1	$2 \times 10^{10}$	1
K-12 MT (plasmid)	$1 \times 10^{11}$	1	$2 \times 10^{10}$	1
K-12 W3101 ( $\lambda$ )	$2 \times 10^{10}$	0.2	$5 \times 10^9$	0.25
K-12 W3110 F <sup>+</sup>	$1 \times 10^{11}$	1	0	-
K-12W 3623	0	-	$4 \times 10^3$	$2 \times 10^{-6}$
K235	0	-	0	-
KP61	0	-	0	-
NIHJ JC2	0	-	0	-

EOP: Efficiency of Plating



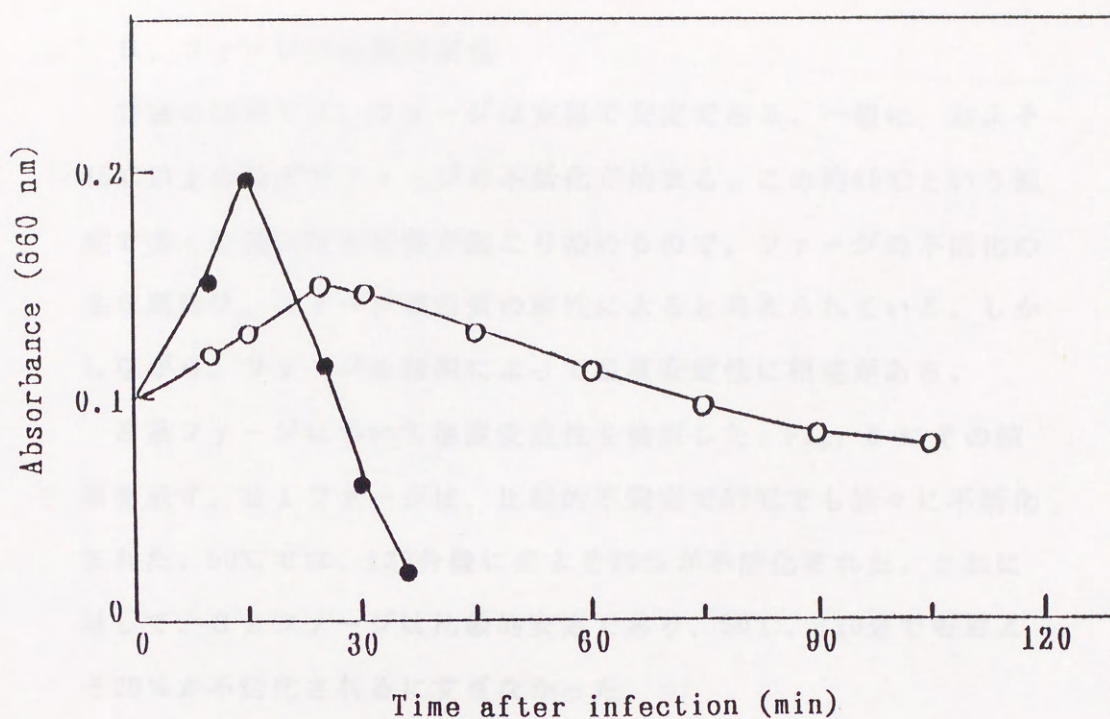


Fig. 5. Lysis of S-phage-infected cells.

*Escherichia coli* K-12 ( $2 \times 10^8$  cells/ml) were infected with phage (m.o.i., ca. 10) in nutrient broth (pH 7.0) and incubated at 37°C.

○, Phage S 1 ; ●, Phage S 2.



する S 1 ファージの潜伏期が28分、S 2 ファージのそれが15分であることと一致している。

#### 5. ファージの温度安定性

普通の培地では、ファージは室温で安定である。一般に、およそ45℃以上の温度でファージの不活化が始まる。この約45℃という温度で多くの蛋白質の変性が起こり始めるので、ファージの不活化の主な原因は、ファージ蛋白質の変性によると考えられている。しかしながら、ファージの種類によって温度安定性に相違がある。

S系ファージについて温度安定性を検討した。Fig. 6 にその結果を示す。S 1 ファージは、比較的不安定で37℃でも徐々に不活化された。50℃では、120分後におよそ70%が不活化された。これに対して、S 2 ファージは比較的安定であり、50℃、120分でもおよそ20%が不活化されるにすぎなかった。

#### 6. ファージの pH 安定性

ファージは、一般にpH 6から8の範囲で安定である。低温では、この範囲が pH 5から9~10にまで広がる。

S系ファージについてpH 安定性を検討した。Fig. 7 にその結果を示す。両ファージとも、pH 7が最も安定で、これから離れるにつれて次第に不安定になっていった。特に、酸性側でより不安定であった。

#### 7. 小括

セリン生産 *Escherichia coli* K-12 の培養溶菌液から2つのファ



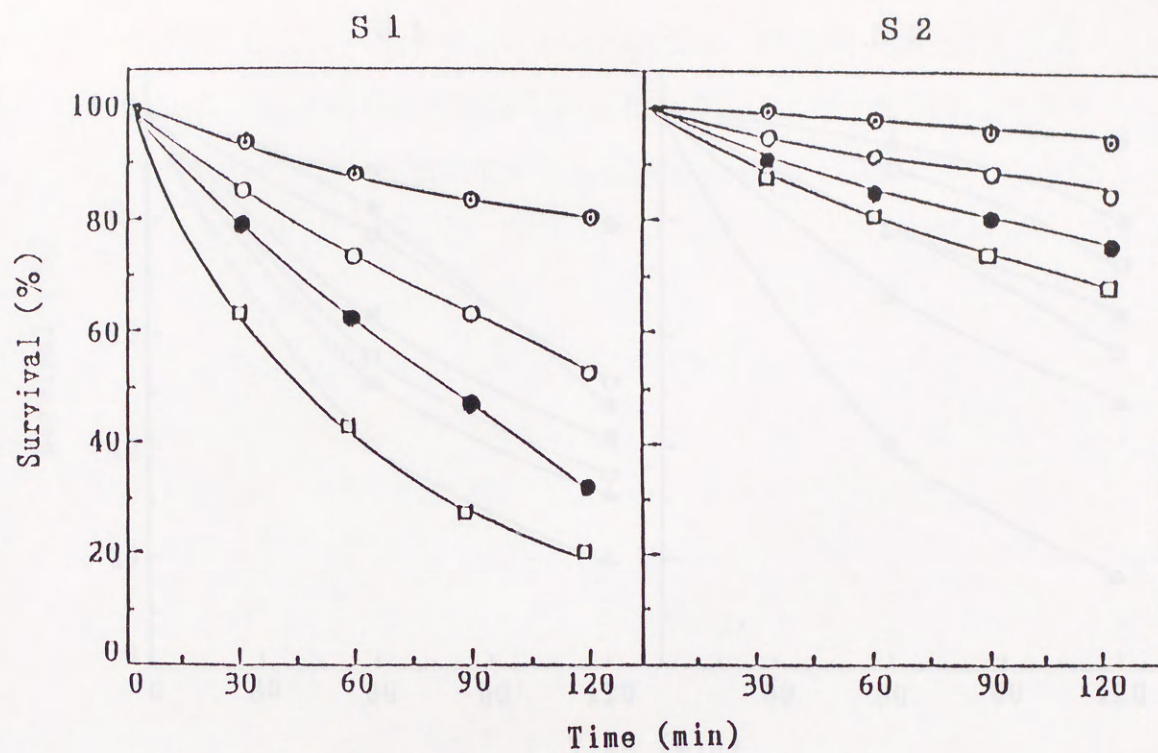


Fig. 6. Thermal stability of S-phages.

Phages ( $2 \times 10^8$  PFU/ml) were incubated in nutrient broth (pH 7.0) at different temperatures. Temperature:  $\odot$ , 37°C;  $\circ$ , 45°C;  $\bullet$ , 50°C;  $\square$ , 55°C.



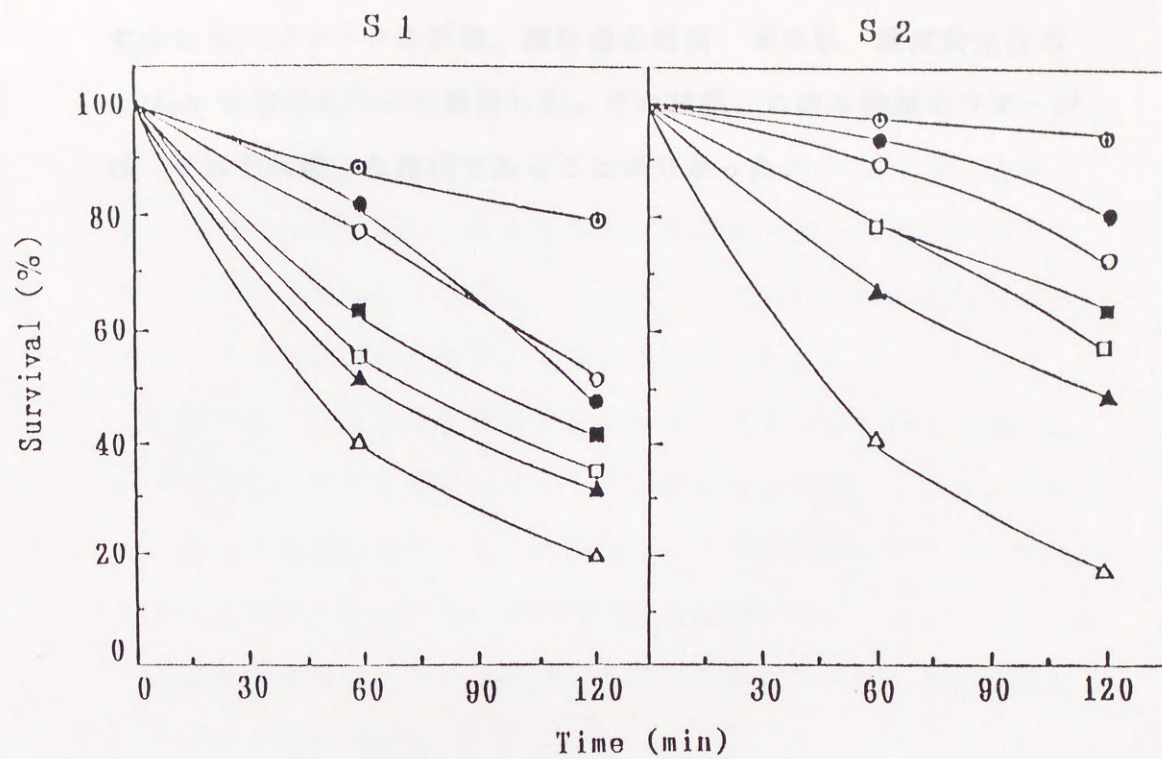


Fig. 7. pH stability of S-phages.

Phages ( $2 \times 10^8$  PFU/ml) were incubated in nutrient broth at different pH values at 37°C. pH:  $\odot$ , 7;  $\Delta$ , 4;  $\square$ , 5;  $\circ$ , 6;  $\bullet$ , 8;  $\blacksquare$ , 9;  $\blacktriangle$ , 10.



ージを分離し、S 1 および S 2 ファージと命名した。

この S 1 および S 2 ファージについて一般的な性状を検討した。  
すなわち、プラークの形態、感染菌の溶菌、宿主域、温度安定性お  
よび pH 安定性について検討した。その結果、この 2 種類のファージ  
は、それぞれ違った性状であることが分かった。



### 第3章 ファージの血清学的性質

#### 1. 緒言

ファージの大部分は、蛋白質からなっている。蛋白質には抗原性があり、したがって、ファージ粒子も抗原として作用する。抗原とは、動物体内に非経口的に投与したとき抗体の産出を促す物質であって、生じた抗体と特異的に反応する。抗原の化学的性質によって決定される特異性はきわめて高度なものである。

血清学的反応を利用することによって、ファージの相違を知ることができる。抗原としてのファージと抗体を含む抗ファージ血清との反応は中和反応であって、実験的には、ファージと抗ファージ血清とを混ぜたときのプラーク数の減少を観察する。

この中和反応は、非常に特異であり、同種あるいは近縁のものとの間だけで反応が起る。

S 1 および S 2 ファージの抗ファージ血清を調製し、血清学的性質について検討し、2種類のファージの蛋白質の相違を明らかにしようとした。

#### 2. 抗ファージ血清とファージの交叉中和反応

調製した抗 S 1 ファージ血清および抗 S 2 ファージ血清の K 価は、220 および 55 であった。

次いで、この2種類のファージと2つの抗ファージ血清を組合せて交叉中和反応を行った。Table 4 にその結果を示す。S 1 ファージは、抗 S 2 ファージ血清と反応せず、S 2 ファージは、抗 S 1 ファージ血清と反応しなかった。



Table 4. Cross-neutralization by anti-S-phage sera  
against S-phages

Phage	Antiphage serum	
	S1	S2
S1	+ (220)	-
S2	-	+ (55)

Phages were diluted to  $4 \times 10^7$  PFU/ml. Sera were diluted 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 and 1:360. Phage dilutions (0.5ml) were mixed with 0.5 ml of serum dilutions, and the mixtures were incubated at 37°C for 5 min. Then, 0.1 ml sample of the mixtures was taken and diluted 1:1000 with chilled broth to stop the neutralizing action of the antisera. Phage survivals were assayed after further dilution was made. The  $K$  value was determined by the following equation.

$$K = 2.3D/t \times \log p/P$$

in which  $p$ =phage assay at time zero,  $P$ =phage assay at time  $t$ ,  $D$ =final dilution of serum in the phage-serum mixture.

+, neutralization; -, no neutralization.

( ) indicates  $K$  value.



このことは、S 1 ファージと S 2 ファージの間に血清学的に関係がないことを示している。

### 3. 抗ファージ血清とその他のファージの中和反応

Escherichia coli のその他のファージと S 系ファージとの相違を知るために、S 系ファージの抗血清を用いて Escherichia coli の代表的な 14 種類のファージと中和反応を行った。これらのファージのうち、T 系ファージと  $\lambda$  ファージは 2 本鎖 DNA、 $\phi$  x 174 ファージと  $\delta$  A ファージは 1 本鎖 DNA ファージ、MS 2、Q  $\beta$ 、GA および SP ファージは RNA ファージである (Table 1)。

Table 5 に結果を示す。S 系ファージの抗血清は、検討した 14 種類のファージとは中和反応を起こさなかった。すなわち、S 1 および S 2 ファージは、既に報告されている Escherichia coli の代表的なファージとは違う、新しいファージであることが分かった。

### 4. 小括

S 系ファージに対する抗ファージ血清を調製し、その K 価を測定したところ、S 1 ファージで 220、S 2 ファージで 55 であった。

S 1 および S 2 ファージと抗 S 1 および S 2 ファージ血清の間で交叉中和反応を行ったところ、S 1 ファージと S 2 ファージの間で交叉中和反応は起こらず、この 2 種類のファージは、血清学的に関係がないことが分かった。

また、抗 S 1 および S 2 ファージ血清と Escherichia coli の代表的な 14 種類ファージの間で中和反応を行ったが、中和反応は認められなかった。すなわち、S 1 および S 2 ファージは、Escherichia



Table 5. Cross-neutralization by anti-S-phage sera  
against different Escherichia coli phages

Phage	Antiphage serum	
	S1	S2
T1	—	—
T2	—	—
T3	—	—
T4	—	—
T5	—	—
T6	—	—
T7	—	—
$\lambda$	—	—
$\phi$ X174	—	—
$\delta$ A	—	—
MS2	—	—
Q $\beta$	—	—
GA	—	—
SP	—	—

See the legend to Table 4.

+, neutralization; —, no neutralization.



coliの既報のファージとは違う、新しいファージであることが分かった。

#### 1. 培養

ファージは、一般に多量体の菌体と特定の菌種を有している。菌体の中には、ひびきあるいはDNAが含まれている。菌体は、菌体培養ではなく、宿主菌への感染源である。菌体の菌体培養においては、ネガティブ染色法(17)で明らかにされてきたファージの形態や大きさ、ファージの菌体によって感染し、しきによって、ファージ分離の一つの基準になっている。

Reedley(18)は、ファージをその菌体による菌体から、A、B、C、D、EおよびFのグループに分類している。

#### 2. ファージの形態と大きさ

ネガティブ染色法によって五系ファージを分離した。Fig. 1にその電子顕微鏡写真を示す。

系1ファージは、多量体の菌体と長い尾を有していて、菌体の直径は70-80nm、尾部の直径は100-110nmであった(Fig. 1-A)。また、菌体と尾部の間の部分が細くされており、尾部は、尾部に感染性の部分が含まれた部分であった(Fig. 1-A')。すなわち、Reedleyの報告するグループに属しており、Escherichia coliのT2でも、系2ファージの形態に類似していた。

系2ファージは、多量体の菌体と長い尾を有していて、菌体の直径は80-90nm、尾部の直径は110-120nmであった。すなわち、Reedleyの報告するグループに属しており、Escherichia coliの系3ファージの形態に類似していた。



## 第4章 ファージの形態

### 1. 緒言

ファージは、一般に多面体の頭部と長短の尾部を有している。頭部の中には、DNAあるいはRNAが含まれている。尾部は、運動器官ではなく、宿主菌への吸着器官である。尾部の微細構造については、ネガティブ染色法(17)で明らかにされてきているファージの形態や大きさは、ファージの種類によって相違し、したがって、ファージ分類の一つの基準になっている。

Bradley(18)は、ファージをその形態による違いから、A、B、C、D、EおよびFのグループに分類している。

### 2. ファージの形態と大きさ

ネガティブ染色法によってS系ファージを観察した。Fig. 8にその電子顕微鏡写真を示す。

S1ファージは、多面体の頭部と太い尾部を有していて、頭部の直径は75~80nm、尾部の長さは150~155nmであった(Fig. 8-A)。また、頭部と尾部の間の頸部が細くなっており、尾部は、尾芯に収縮性の鞘筒がかぶさった構造であった(Fig. 8-A')。すなわち、Bradley分類のAグループに属しており、*Escherichia coli* のT2、T4、T6ファージの形態に類似していた。

S2ファージは、多面体の頭部と長細い尾部を有していて、頭部の直径は55~60nm、尾部の長さは155~160nmであった。すなわち、Bradley分類のBグループに属しており、*Escherichia coli* の $\lambda$ ファージの形態に類似していた。



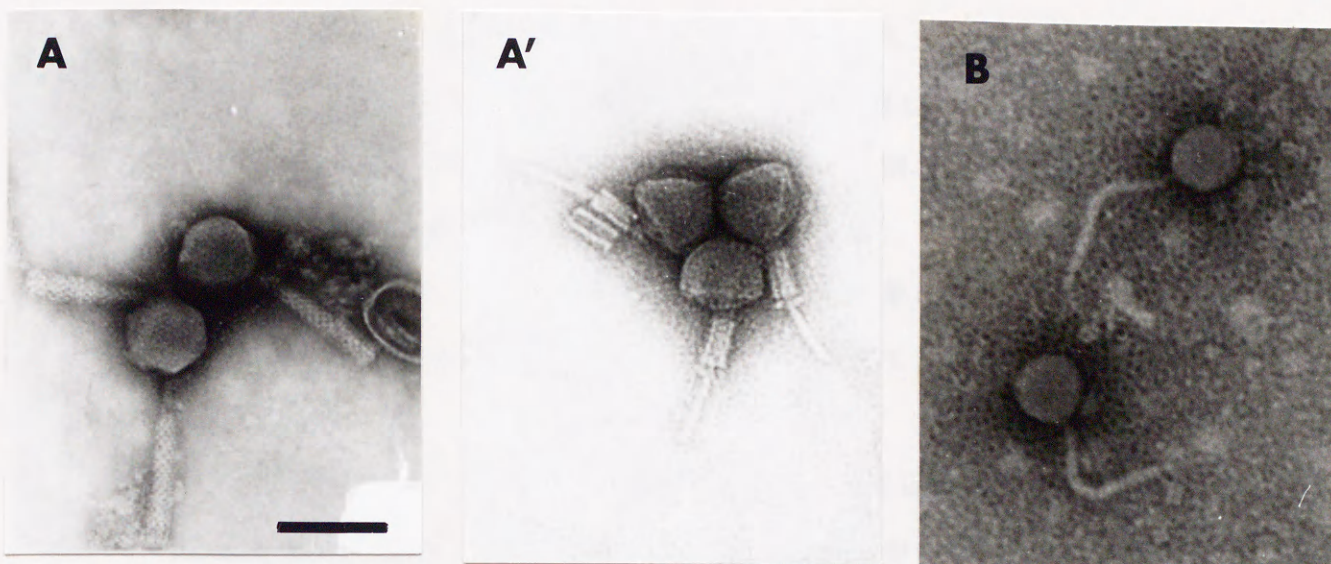


Fig. 8. Electron micrographs of S-phages.

Purified phages were diluted to about  $10^{10}$  PFU/ml in 0.05M sodium acetate buffer (pH 6.0), negatively stained with 1% uranyl acetate (pH 5.0), and examined in a JEM-100B electron microscope.

A, Non-contracted form of phage S1; A' , Contracted form of phage S1; B, Phage S2.

The bar represents 100 nm.



このように、S 1 ファージと S 2 ファージは、形態的に相違することが分かった。

### 3. 考察

S 1 ファージと S 2 ファージは、形態的に相違していた。

S 1 ファージは、Bradley分類の A グループに属しており、Escherichia coli の T 2、T 4、T 6、P 1、P 2 と同じグループである。しかし、Table 6 (4、19) に示すように、T 2、T 4、T 6 ファージとは、頭部の形態が違っており、尾部の長さも短い。また、P 1、P 2 とは、頭部の大きさが違っていて、S 1 ファージの方が大きい。

S 2 ファージは、Bradley分類の B グループに属しており、Escherichia coli の  $\lambda$ 、T 1、T 5 ファージと同じグループである。しかし、表に示すように、それらのファージとは、頭部の大きさが違っていて、S 2 ファージの方が大きい。

このように、S 1 および S 2 ファージの形態は、Escherichia coli の既報のファージのそれと違っていることが分かった。

### 4. 小括

S 系ファージの形態と大きさについて検討した。S 1 ファージは、直径 75~80nm の多面体の頭部に長さ 150~155nm の尾部を有していた。尾部は、尾芯に収縮性の鞘筒がかぶさった構造であった。Bradley の分類の A グループに属することが分かった。

S 2 ファージは、直径 55~60nm の頭部に長さ 155~160nm 長細い尾部を有しており、Bradley の分類の B グループに属することが分かった。



Table 6. List of sizes of other Escherichia coli  
phages

Phage	Head (nm)	Tail (nm)
T1	50	150
T2, T4, T6	65 × 95	110
T3, T7	47	15
T5	65	170
P1	65	150
P2	50	150
φ X174, S13	30	—
f2, MS2, Q β , GA	24	—
f1, fd	—	800
λ , φ 80	54~57	140~150



このように、S1ファージとS2ファージは、形態的に相違して  
いた。

#### ファージの増殖

##### 1. 概要

ファージ増殖の過程は、一般に、吸着→複製侵入→メッセン  
ジャーRNA合成→初級宿主細胞内複製→ファージの宿主細胞内複製→後期  
宿主細胞内複製→成熟→脱落→ファージ放出、という順序で進行する。

ここでは、ふたつおよびるSファージの増殖および増殖について考  
察した。

##### 2. ファージの増殖

ファージの増殖への影響は、ファージ増殖の過程の各段階である。  
ファージの増殖には、特定の温度・pHの範囲が必要とされる  
ことが多い。更に、ファージによっては宿主細胞とファージのよう  
な相互作用が必要となることもある。

各Sファージの増殖について観察した結果を以下に示す。ふた  
つファージの増殖は、速く、20時間で増殖のピークであった。これに  
対して、ふたつファージの増殖は、速く、24時間で増殖、18分間で増  
殖であった。すなわち、ふたつファージとふたつファージでは、増殖  
の増殖が速いことが分かった。

##### 3. ファージの増殖に及ぼす温度、pHおよび宿主細胞の影響

ファージの増殖への影響は、温度・pH・宿主細胞などによって  
異なる。したがって、ファージ増殖の条件としてファージの増  
殖への影響を考慮する場合、ファージの増殖に影響する因子につい



## 第5章 ファージの吸着および増殖

### 1. 緒言

ファージ感染の過程は、一般に、吸着→核酸注入→メッセンジャーRNA合成→初期蛋白質合成→ファージDNA複製→後期蛋白質合成→成熟→溶菌→ファージ放出、という順序で進行する。

ここでは、S1およびS2ファージの吸着および増殖について検討した。

### 2. ファージの吸着

ファージの菌への吸着は、ファージの感染の最初の段階である。ファージの吸着には、特定の陽イオンの適当な濃度が必要とされることが多い。更に、ファージによってはL-トリプトファンのような補助因子が必要とされることもある。

S系ファージの吸着について検討した結果をFig. 9に示す。S1ファージの吸着は、速く、3分間で90%の吸着率であった。これに対して、S2ファージの吸着は、遅く、5分間で30%、10分間でも35%であった。すなわち、S1ファージとS2ファージでは、吸着の特性が違っていることが分かった。

### 3. ファージの吸着に及ぼす温度、金属およびアミノ酸の影響

ファージの菌への吸着は、菌の生理状態、環境状態などによって影響される。したがって、ファージ対策の一つとしてファージの菌への吸着阻止を考える場合、ファージの吸着に影響する因子につい



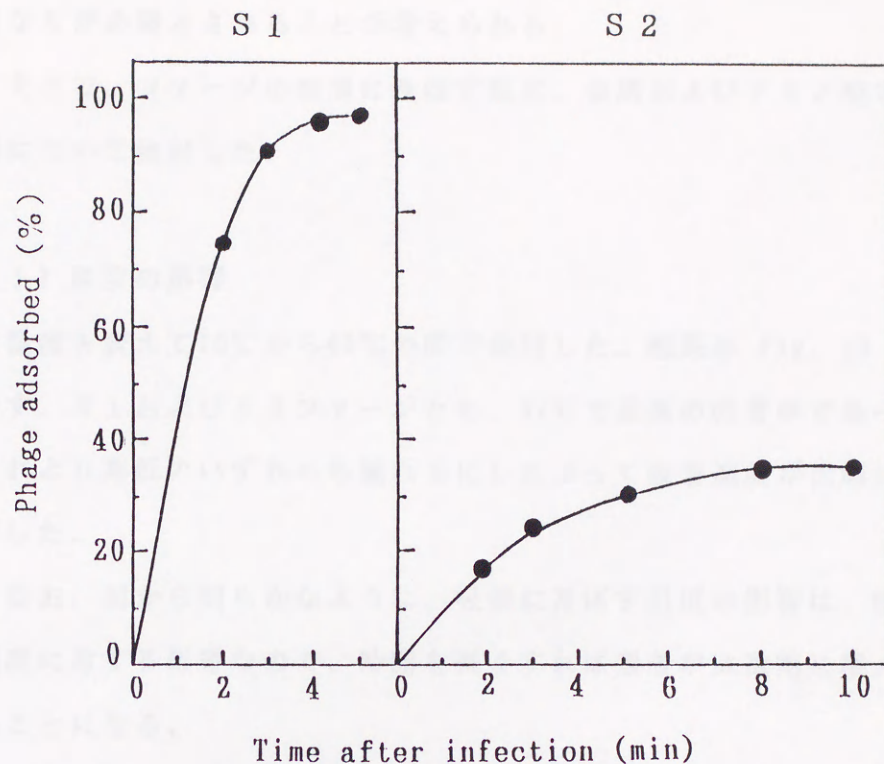


Fig. 9. Adsorption of S-phages onto host bacterial cells.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were mixed with phage (m.o.i., ca. 1) in nutrient broth (pH 7.0), and the mixture was incubated at  $37^\circ\text{C}$ . The unadsorbed phages were assayed by a 100-fold dilution of adsorption mixture, following by sedimentation of adsorbed phages by centrifugation.



て検討する必要がある。また、上述したように、S 2 フェージでは吸着が遅いので、このフェージの吸着に特定の金属イオンやアミノ酸などが必要とされることが考えられる。

そこで、フェージの吸着に及ぼす温度、金属およびアミノ酸の影響について検討した。

#### 1) 温度の影響

温度を変えて10℃から45℃の間で検討した。結果は Fig. 10 に示す。S 1 および S 2 フェージとも、37℃で最高の吸着率であった。それより高低のいずれへも離れるにしたがって吸着速度が次第に低下した。

なお、図から明らかなように、吸着に及ぼす温度の影響は、吸着速度に対する影響なので、時間を長くすれば吸着率は次第に増大することになる。

#### 2) 金属イオンの影響

I 価および II 価の金属イオンの吸着に及ぼす影響について検討した。結果は Table 7 に示す。2 価のカルシウムとマグネシウムは、濃度の増加につれて、S 1 および S 2 フェージの吸着を次第に促進した。また、1 価のナトリウムとカリウムも濃度の増加につれて、S 1 および S 2 フェージの吸着を次第に促進することが分かった。しかし、S 2 フェージの場合、促進の程度はわずかであった。

2 価の金属と 1 価の金属との相違は、その有効濃度に違いがあることで、2 価の金属のほうが 1 価の金属の 1/10 以下の濃度で同程度の促進効果を示した。



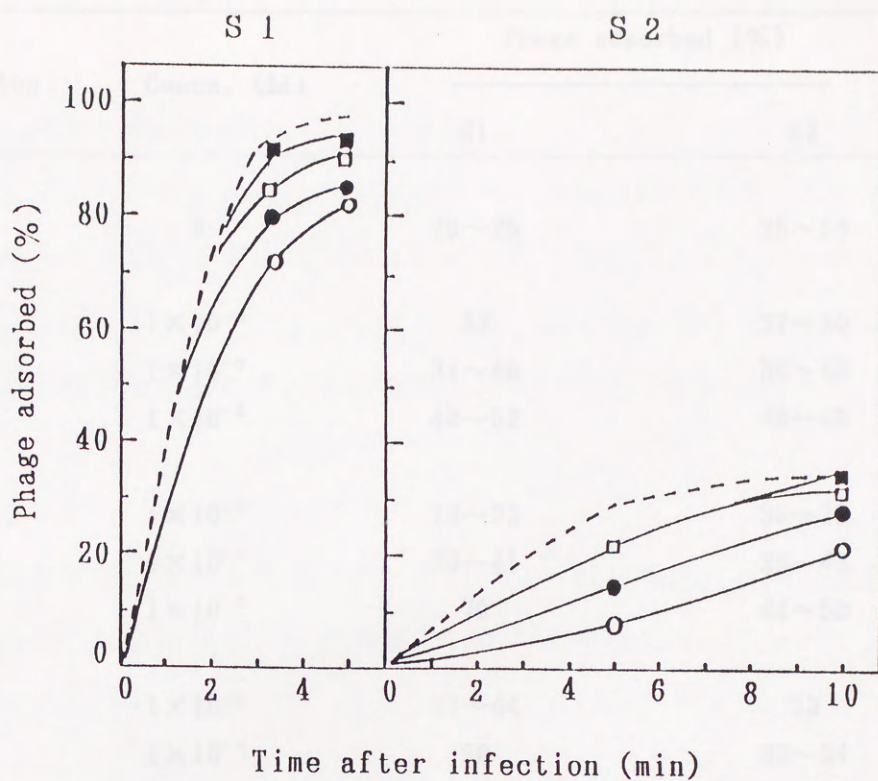


Fig. 10. Effects of temperature on adsorption of S-phages.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were mixed with phage (m.o.i., ca. 1), and the mixture was incubated at different temperatures.

See the legend to Fig. 9. Temperature: ---, 37°C; O, 10°C; ●, 20°C; □, 30°C; ■, 45°C.



Table 7. Effects of metal ions and amino acids on adsorption of S-phages

Addition	Concn. (M)	Phage adsorbed (%)	
		S1	S2
None	0	20~25	25~30
Ca <sup>++</sup>	1 × 10 <sup>-4</sup>	22	27~30
	1 × 10 <sup>-3</sup>	34~40	36~43
	1 × 10 <sup>-2</sup>	48~52	48~49
Mg <sup>++</sup>	1 × 10 <sup>-4</sup>	28~33	35~39
	1 × 10 <sup>-3</sup>	30~41	39~43
	1 × 10 <sup>-2</sup>	70	44~50
Na <sup>+</sup>	1 × 10 <sup>-3</sup>	37~44	33
	1 × 10 <sup>-2</sup>	50	33~34
	1 × 10 <sup>-1</sup>	50~60	33~34
K <sup>+</sup>	1 × 10 <sup>-3</sup>	22~27	32~33
	1 × 10 <sup>-2</sup>	28~34	36~38
	1 × 10 <sup>-1</sup>	56~61	36~39
L-Tryptophan	1 × 10 <sup>-4</sup>	28~30	36
	1 × 10 <sup>-3</sup>	34~36	45
	5 × 10 <sup>-2</sup>	42~46	45~49
L-Serine	1 × 10 <sup>-4</sup>	28~30	29~33
	1 × 10 <sup>-3</sup>	30~36	34~35
	1 × 10 <sup>-2</sup>	37~40	37

Bacterial cells were twice washed with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.4), and mixed with phage (m.o.i., ca. 1) in the buffer. A reagent was added just prior to adsorption, and the mixtures were incubated for 5 min.



なお、S 1 ファージの吸着率が95%でなく、20~25%であるのは、培地中でなく、洗浄菌を使用して緩衝液中で吸着させたためである。

### 3) アミノ酸の影響

S系ファージの宿主菌がアミノ酸のセリン生産菌であることから、若干のアミノ酸の吸着に及ぼす影響について検討した。Table 7 に示すように、トリプトファンとセリンは、S 1 およびS 2 ファージの吸着を若干促進したが、その程度は著しいものではなかった。

### 4. ファージの増殖

一段階増殖実験法を使用して、S系ファージの増殖について検討し、更に、細胞内ファージの増殖についても検討した。Fig. 11 にその結果を示す。暗黒期は、S 1 ファージで15分、S 2 ファージで7分であった。潜伏期は、S 1 ファージで28分、S 2 ファージでは15分であった。バーストサイズは、S 1 ファージで約450、S 2 ファージでは約100であった。

このことから、S 1 ファージは、潜伏期が長くバーストサイズも大きい、S 2 ファージは、潜伏期が短くバーストサイズも小さいことが分かった。すなわち、S 1 ファージとS 2 ファージでは、増殖の特性が違っていることが示された。

### 5. ファージの増殖に及ぼす温度およびpHの影響

宿主菌に依存しているファージの増殖は、当然、その宿主菌の生理状態や環境条件などによって影響される。一般には、菌の生育の最適条件においてファージの増殖も最適である。



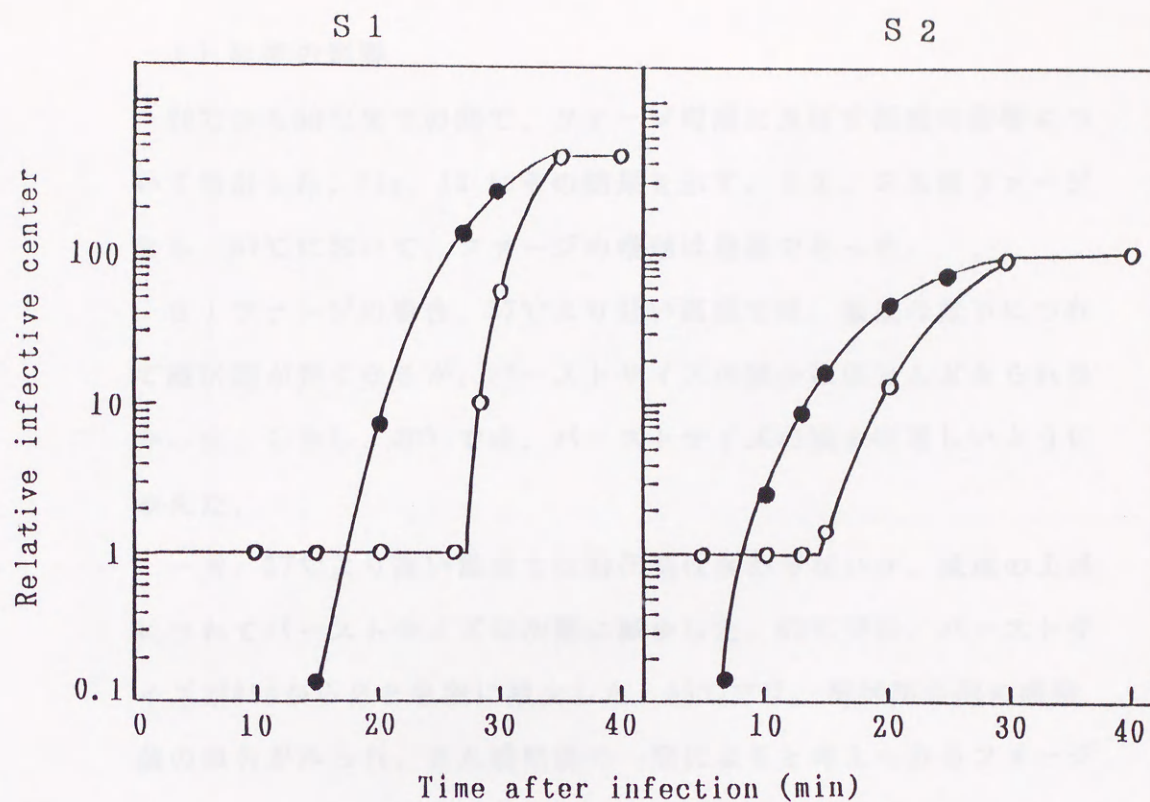


Fig. 11. One-step growth and intracellular growth of S-phages.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were infected with phage (m.o.i., ca. 0.1). After 3 min of adsorption and 2 min of antiserum treatment, the infected cells were diluted 1:2000 into nutrient broth and incubated at  $37^\circ\text{C}$ . The number of initial infected cells is represented as 1.

In the case of estimation of intracellular phages, an aliquot was withdrawn from one-step growth tube and incubated with 1/20 volume of  $\text{CHCl}_3$  for 10 min at  $37^\circ\text{C}$ .

○, One-step growth curve; ●, Intracellular growth curve.



S系ファージの増殖に及ぼす温度とpHの影響について検討した。

#### 1) 温度の影響

20℃から50℃までの間で、ファージ増殖に及ぼす温度の影響について検討した。Fig. 12 にその結果を示す。S 1、S 2 両ファージとも、37℃において、ファージの増殖は最適であった。

S 1 ファージの場合、37℃より低い温度では、温度の低下につれて潜伏期が長くなるが、バーストサイズの減少はほとんどみられなかった。しかし、20℃では、バーストサイズの減少は著しいようにみえた。

一方、37℃より高い温度では潜伏期は変わらないが、温度の上昇につれてバーストサイズは次第に減少した。43℃では、バーストサイズが450から2と急激に減少した。45℃では、潜伏期の間に感染菌の喪失がみられ、また感染菌の一部によると考えられるファージのバーストもみられたが、全体としてはファージの増殖は抑えられた。48℃では、感染菌が急速に喪失した。なお、43℃でバーストサイズが急激に減少することから、S 1 ファージは温度感受性のファージであると考えられる。

S 2 ファージの場合、37℃より低い温度では、潜伏期の延長につれて、バーストサイズも次第に減少した。37℃より高い温度では、潜伏期は変わらず、温度の上昇につれてバーストサイズは次第に減少するが、S 1 ファージの場合と違って、48℃までファージのバーストが起こった。50℃では、感染菌のゆるやかな喪失がみられた。すなわち、50℃ではS 2 ファージの増殖は、完全に抑えられることが分かった。



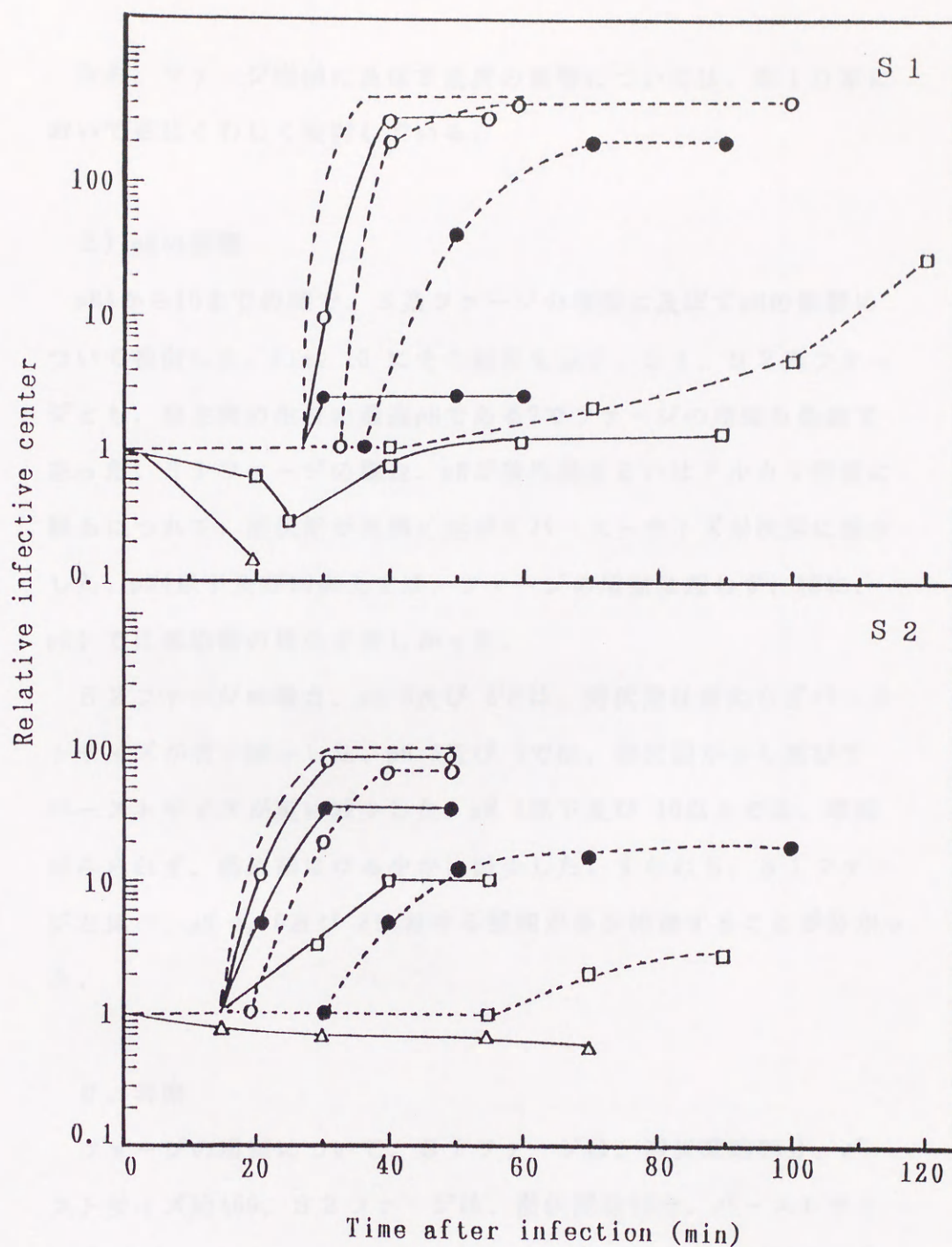


Fig. 12. Effects of temperature on one-step growth of S-phages.

See the legend to Fig. 11.

Temperature:  $\cdots$ , 37°C;  $\cdots \square \cdots$ , 20°C;  $\cdots \bullet \cdots$ , 25°C;

$\cdots \circ \cdots$ , 30°C;  $- \circ -$ , 40°C;  $- \bullet -$ , 43°C;  $- \square -$ , 45°C;

$- \blacksquare -$ , 48°C;  $- \triangle -$ , 50°C.



なお、ファージ増殖に及ぼす温度の影響については、第10章において更にくわしく検討している。

## 2) pHの影響

pH4から10までの間で、S系ファージの増殖に及ぼすpHの影響について検討した。Fig. 13 にその結果を示す。S 1、S 2両ファージとも、宿主菌の生育の最適pHである7でファージの増殖も最適であった。S 1ファージの場合、pHが酸性側あるいはアルカリ性側に移るにつれて、潜伏期が次第に延びてバーストサイズが次第に減少した。pH4以下及び10以上では、ファージの増殖は起らず、特に、pH4 では感染菌の喪失が著しかった。

S 2ファージの場合、pH 6及び 8では、潜伏期は変わらずバーストサイズが若干減少した。pH 5及び 9では、潜伏期が少し延びてバーストサイズが更に減少した。pH 4以下及び 10以上では、増殖はみられず、感染菌はゆるやかに減少した。すなわち、S 1ファージと比べ、pH 4、6及び 8における様相が多少相違することが分かった。

## 6. 考察

ファージの増殖について、S 1ファージは、潜伏期約28分、バーストサイズ約450、S 2ファージは、潜伏期約15分、バーストサイズ約100であった。Table 8 (19) に、*Escherichia coli*の既報のファージの潜伏期とバーストサイズを示す。実験条件が相違するので厳密な比較はできないにしても、S 1ファージおよびS 2ファージと同じような増殖特性を示すファージはない。



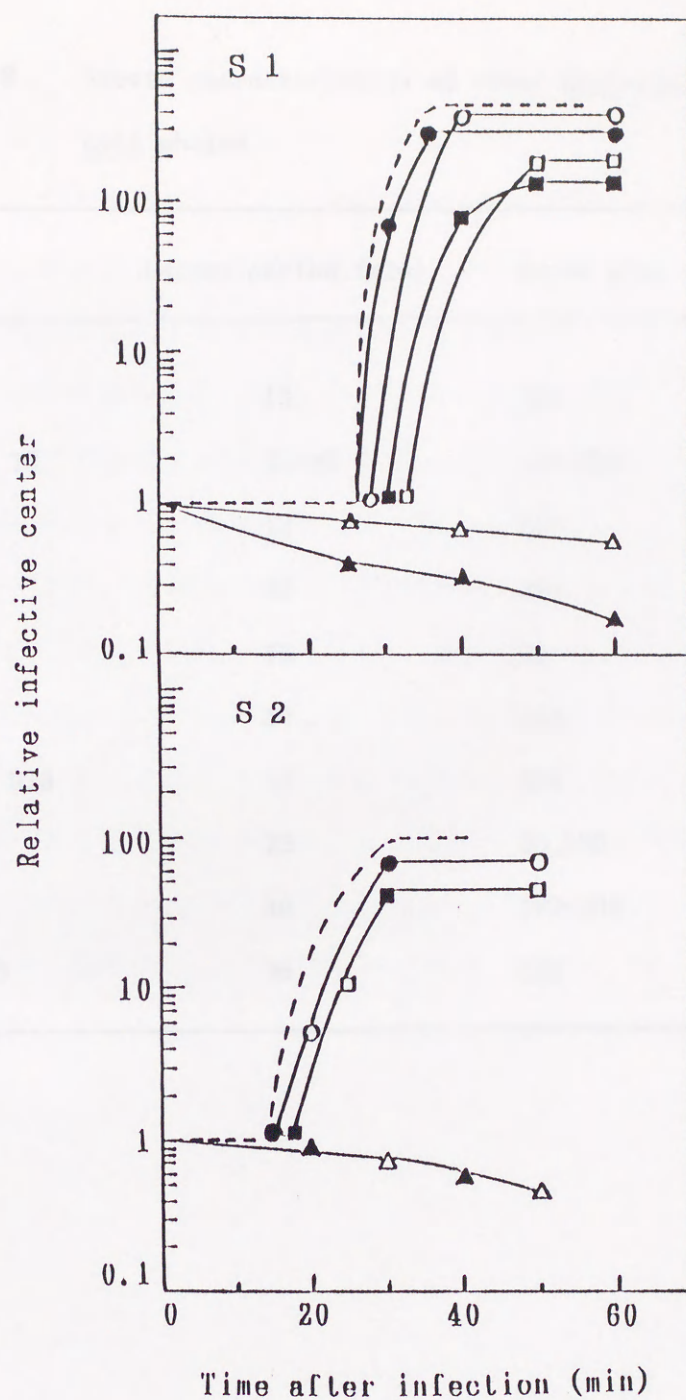


Fig. 13. Effect of pH on one-step growth of S-phages.

See the legend to Fig. 11.

pH : ..., 7;  $\Delta$ , 4;  $\square$ , 5;  $\circ$ , 6;  $\bullet$ , 8;  $\blacksquare$ , 9;  $\blacktriangle$ , 10.



Table 8. Growth characteristics of other Escherichia  
coli phages

Phage	Latent period (min)	Burst size
T1	13	150
T2, T4, T6	21~25	150~400
T3, T7	13	300
T5	40	200
P1	45	80
P2	30	120
$\phi$ X174, S13	13	180
f2, MS2	22	20,000
f1, fd	30	100~200
$\lambda$ , $\phi$ 80	35	100



## 7. 小括

まず、S系ファージの吸着について検討した。

S 1 ファージの吸着は速く、3分間で90%の吸着率であった。これに対して、S 2 ファージの吸着は遅く、10分間でも35%の吸着率であった。吸着に及ぼす温度の影響について検討し、37℃で吸着率が最も高いことが分かった。更に、I価及びII価の金属イオンやある種のアミノ酸が吸着に影響を及ぼすことが分かった。

次いで、S系ファージの増殖について検討した。

S 1 ファージは、暗黒期15分、潜伏期28分、パーストサイズ約450であった。S 2 ファージは、暗黒期7分、潜伏期15分、パーストサイズ約100であった。ファージの増殖に及ぼす温度およびpHの影響について検討し、S 1、S 2 両ファージとも、37℃およびpH 7において増殖が最適であることが分かった。S 1 ファージは、45℃以上、pH 4以下およびpH 10以上でファージの増殖がみられなかった。S 2 ファージでは、50℃以上、pH 4以下およびpH 10以上でファージの増殖がみられなかった。



## 第6章 ファージの核酸

### 1. 緒言

ファージは、化学的に核酸と蛋白質からなっている。ファージの核酸は、DNAあるいはRNAのいずれかであり、そのポリヌクレオチド鎖は、2本あるいは1本である。しかしながら、大多数のファージの核酸は、2本鎖DNAである。

核酸を構成する塩基については、アデニン、グアニン、シトシン、チミンなどの通常の塩基が大部分であるが、ある種のファージには特殊な塩基が存在している。例えば、*Escherichia coli* のT2、T4、T6ファージは、シトシンを含まず代りにヒドロキシメチルシトシンを含んでいる。また、*Bacillus subtilis* のSP8ファージは、チミンの代りにヒドロキシメチルウラシルを含んでいる。

最近では、ファージDNAの研究は著しく進展しており、マクロ的にはその大きさや立体構造、ミクロ的にはその塩基配列に至るまで解明されようとしている。

### 2. ファージの核酸

S1およびS2ファージの核酸について研究した。まず、核酸の種類について検討した。S1およびS2ファージから分離した核酸について、DNAに特異的なジフェニルアミン反応およびRNAに特異的なオルシノール反応を行ったところ、両ファージの核酸ともジフェニルアミン反応のときだけ発色した。したがって、S1およびS2ファージの核酸は、DNAであることが分かった。



### 3. ファージDNAの塩基成分

S1およびS2 DNAについて、その塩基成分をペーパークロマトグラフ法で検討した。この結果、両ファージとも、ペーパークロマトグラフ上に4つのスポットが検出され、スタンダードの塩基スポットとの比較検討から、グアニン、アデニン、シトシンおよびチミンであると同定された。すなわち、S1およびS2 DNAは、通常の4つの塩基からなり、特殊な塩基を含有していないことが分かった。

### 4. ファージDNAの熱変性および塩基組成

Dotyら(20)によって見出されたDNAの熱変性(meltingあるいはthermal denaturation)は、DNAのシトシン-グアニン含量(以下、GC含量と略)を知る簡便な方法である。DNAの熱変性点(以下、 $T_m$ と略)は、GC含量と正比例の関係にあつて、GC含量が高いほど $T_m$ の値が高い。従つて、 $T_m$ 値を測定することによつてDNAのGC含量を求めることができるのである。すなわち、Marmur-Doty(12)の実験式

$$GC\% = (T_m - 69.3) / 0.14$$

によつてGC含量が求められる。

S1およびS2 DNAについて熱変性曲線を描き、 $T_m$ を求めた。熱変性曲線はFig. 14に示す。S1 DNAでは、78℃から90℃までの間で吸光度が上昇し、 $T_m$ は82℃であつた。S2 DNAでは、83℃から93℃の間で吸光度が上昇し、 $T_m$ は85℃であつた。得られた $T_m$ 値を用いてMarmur-Dotyの式で計算すると、S1 DNAのGC含



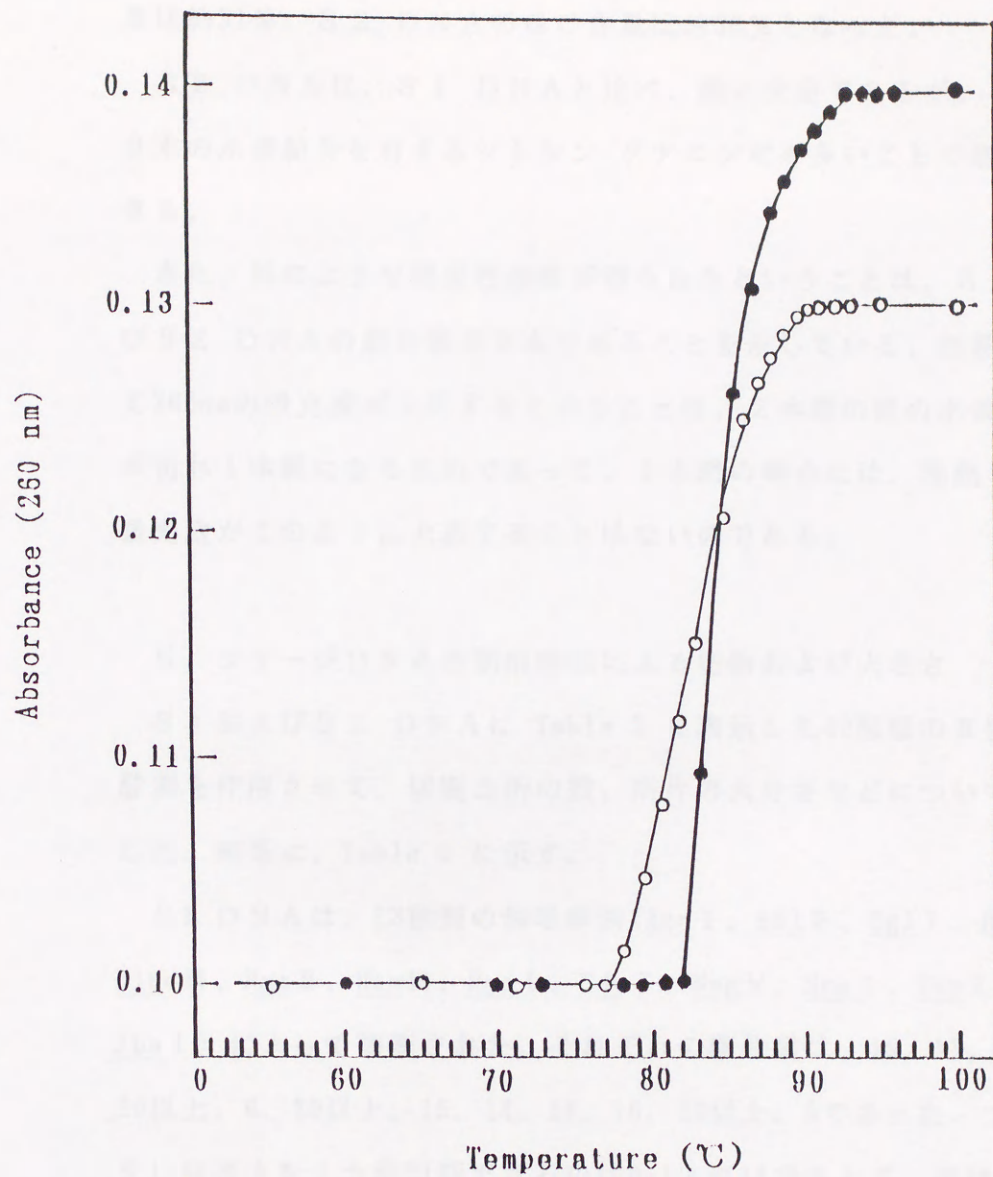


Fig. 14. Thermal denaturation curves of S1 and S2 DNAs.

DNA solutions (ca,  $20 \mu\text{g/ml}$  in standard saline-citrate) were heated in small glass tubes at the rate of  $1^\circ\text{C}$  up per 2 min, about 10 min were allowed for equilibration at each temperature, and chilled to  $0^\circ\text{C}$  in a few seconds.

O, S 1 DNA; ●, S 2 DNA.



量は約31%、S2 DNAのGC含量は約38%となった。

S2 DNAは、S1 DNAと比べ、熱に安定であるが、これは3本の水素結合を有するシトシン-グアニン対が多いことで説明できる。

また、図のような熱変性曲線が得られたということは、S1およびS2 DNAの鎖の数が2本であることを示している。加熱によって260nmの吸光度が上昇するということは、2本鎖の間の水素結合が切れ1本鎖になるためであって、1本鎖の場合には、加熱しても吸光度がこのように上昇することはないのである。

#### 5. ファージDNAの制限酵素による切断および大きさ

S1およびS2 DNAに Table 2 に表示した40種類のII型制限酵素を作用させて、切断力所の数、断片の大きさなどについて検討した。結果は、Table 9 に示す。

S1 DNAは、13種類の制限酵素(Acc I、Afl II、Bgl I、Bst E II、Hind III、Hae II、Hae III、Hpa I、Nde I、Nsp V、Sca I、Ssp I、Xba I) によって切断された。それぞれの断片数は、19、15、2、18、20以上、6、20以上、15、14、14、16、20以上、8であった。つまり、S1 DNAを1カ所切断できるのはBgl I だけであって、他は、5カ所以上の切断であった。

S2 DNAは、14種類の制限酵素(Acc I、Afl II、Ava I、Bgl I、Bgl II、Hinc II、Hae II、Hae III、Hpa I、Mlu I、Nde I、Nsp V、Stu I、Ssp I) によって切断された。それぞれの断片数は、11、7、2、2、16、20以上、8、20以上、13、8、7、20以上、3、20以上であった。つまり、S2 ファージDNAを1カ所切断できるのはAva I



Table 9. Effects of restriction endonucleases on S1 and S2 DNAs

Enzyme	Number of DNA fragments		Enzyme	Number of DNA fragments	
	S1	S2		S1	S2
<u>Acc</u> I	19	11	<u>Pvu</u> II	0	0
<u>Afl</u> II	15	7	<u>Mlu</u> I	0	8
<u>Apa</u> I	0	0	<u>Mro</u> I	0	0
<u>Ava</u> I	0	2	<u>Nar</u> I	0	0
<u>Axy</u> I	0	0	<u>Nde</u> I	14	7
<u>Bgl</u> I	2	2	<u>Nco</u> I	0	0
<u>Bgl</u> II	0	16	<u>Not</u> I	0	0
<u>BstE</u> II	18	0	<u>Nsp</u> V	14	>20
<u>BamH</u> I	0	0	<u>Nhe</u> I	0	0
<u>Dra</u> I	0	0	<u>Rsa</u> I	0	0
<u>EcoR</u> I	0	0	<u>Sma</u> I	0	0
<u>Eco</u> 0109 I	0	0	<u>Sal</u> I	0	0
<u>EcoR</u> V	0	0	<u>Sau3A</u> I	0	0
<u>Hinc</u> II	0	>20	<u>Stu</u> I	0	3
<u>Hind</u> III	>20	0	<u>Sca</u> I	16	0
<u>Hae</u> II	6	8	<u>Sac</u> I	0	0
<u>Hae</u> III	>20	>20	<u>Sac</u> II	0	0
<u>Hpa</u> I	15	13	<u>Ssp</u> I	>20	>20
<u>Kpn</u> I	0	0	<u>Xba</u> I	8	0
<u>Pst</u> I	0	0	<u>Xho</u> I	0	0

S1 and S2 DNAs were digested with a restriction endonuclease, and the DNA fragments were electrophoresed on 1% agarose gel at 100 V for 60 min.



および Bgl I、2カ所切断できるのは Stu I であった。

この結果は、S 1 および S 2 ファージのゲノムがこれら17種類の制限酵素に対して違う制限位置を持っていることを示している。

Fig. 15 は、S 1 および S 2 DNA に、Acc I、Ava I、Hind III、Stu I、Sca I、Mlu I を作用させたときの電気泳動パターンを示す。S 1 DNA と S 2 の DNA が異なることを明白に示している。

Fig. 16 および Fig. 17 は、ファージ DNA の大きさを知るために適当と考えられた制限酵素 (S 1 DNA に対しては Hae II および Acc I、S 2 DNA に対しては Acc I および Mlu I) を作用させたときの電気泳動パターンを示す。

S 1 DNA の場合、Hae II によって 6断片に切断されるが、断片の大きさは、大きい順に、21.5、9.5、9、7、3.6、1.4 kbp であり、合計すると 52 kbp になる。また、Acc I によって 19断片に切断されるが、断片の大きさは、大きい順に、7.2、6.0、4.8、4.6、3.5、3.0、2.9、2.8、2.5、2.3、2.2、2.0、1.9、1.8、1.7、1.2、0.8、0.7、0.5 kbp であり、合計すると 52.4 kbp になる。すなわち、S 1 DNA の大きさは、約 52 kbp であることが分かった。

S 2 DNA の場合、Acc I によって 11断片に切断されるが、断片の大きさは、大きい順に、13、12、5.6、4.1、3.8、3.5、2.4、1.3、1.1、0.9、0.8 kbp であり、合計すると 48.5 kbp になる。また、Mlu I によって 8断片に切断されるが、断片の大きさは、大きい順に 14、9.6、9.2、8.6、3.5、2.4、1.7、1.3 kbp であり、合計すると 50.3 kbp になる。すなわち、S 2 DNA の大きさは、約 49 kbp であることが分かった。



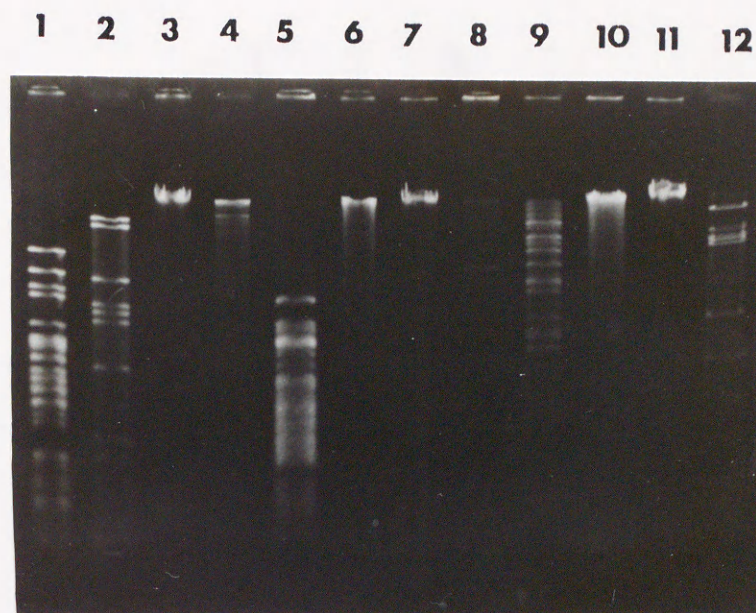


Fig. 15. Comparison of restriction patterns in S1 and S2 DNAs.

DNAs were digested with an endonuclease and electrophoresed in 1% agarose gel at 100 V for 60 min. Sample volume, 10  $\mu$ l.

1. S1 DNA cleaved with Acc I ;    2. S2 DNA cleaved with Acc I ;
3. S1 DNA cleaved with Ava I ;    4. S2 DNA cleaved with Ava I ;
5. S1 DNA cleaved with HindIII ;    6. S2 DNA cleaved with HindIII ;
7. S1 DNA cleaved with Stu I ;    8. S2 DNA cleaved with Stu I ;
9. S1 DNA cleaved with Sca I ;    10. S2 DNA cleaved with Sca I ;
11. S1 DNA cleaved with Mlu I ;    12. S2 DNA cleaved with Mlu I .



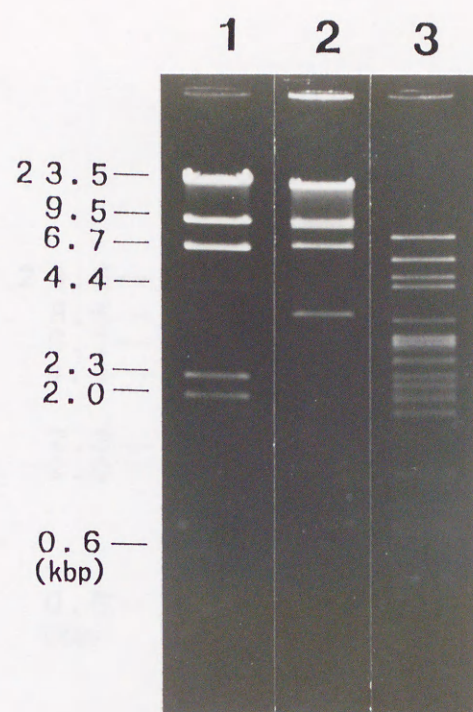


Fig. 16. Patterns of endonuclease-digested S1 DNA fragments by agarose gel electrophoresis.

See the legend to Fig. 15.

1,  $\lambda$  DNA cleaved with HindIII; 2, S1 DNA cleaved with HaeII;

3, S1 DNA cleaved with AccI.



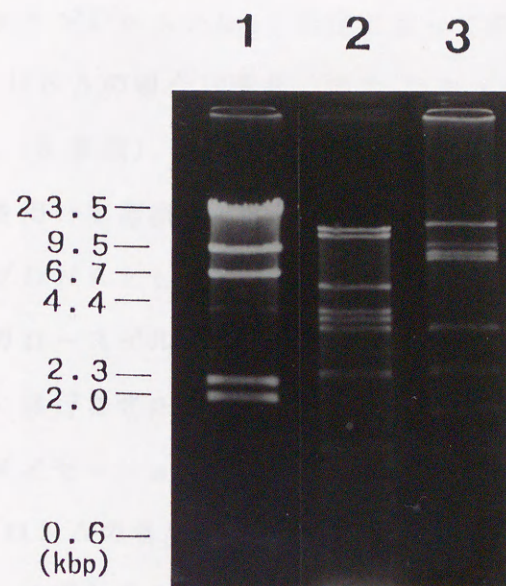


Fig. 17. Patterns of endonuclease-digested S2 DNA fragments by agarose gel electrophoresis.

See the legend to Fig. 15.

1,  $\lambda$  DNA cleaved with HindIII; 2, S2 DNA cleaved with AccI;

3, S2 DNA cleaved with MluI.



## 6. ファージゲノムの相同性の検討

S 1 および S 2 ファージゲノムの相同性について、サザンブロットハイブリダイゼーション法で検討した。

ファージ DNA の Acc I 消化によって得られる DNA 断片は、S 1 DNA の場合 19 断片、S 2 DNA の場合 11 断片であった (Fig. 15 参照)。これらのファージ DNA 断片をジゴキシゲニン-dUTP を用いて標識し、サザンブロットハイブリダイゼーションのプロープ DNA とした。一方、Acc I 消化した S 1 および S 2 DNA をアガロースゲル電気泳動で分離した後、ニトロセルロースフィルターに移行させた。Fig. 18 に、S 2 DNA プロープを用いてハイブリダイゼーションを行った結果を示す。S 2 DNA プロープは、S 2 DNA の各 Acc I 消化断片のすべてと反応したが、S 1 DNA では、いずれの DNA 断片とも反応しなかった。他方、S 1 DNA プロープを用いてハイブリダイゼーションを行った場合は、S 1 DNA 断片と反応したが、S 2 DNA 断片とは反応しなかった。以上の結果から、S 1 および S 2 ファージゲノムには相同性がなく、互いに遺伝的に異なるファージであることが判明した。

## 7. 考察

S 1 および S 2 ファージの核酸は、通常の 4 つの塩基を含む 2 本鎖 DNA であった。S 1 DNA の GC 含量は約 31% であったが、この値は、*Escherichia coli* の既報のファージの中では、一番低い方である。他方、S 2 DNA GC 含量の約 38% は、T 偶数ファージの約 35% より少し高い (21)。

サザンブロットハイブリダイゼーション法で S 1 および S 2



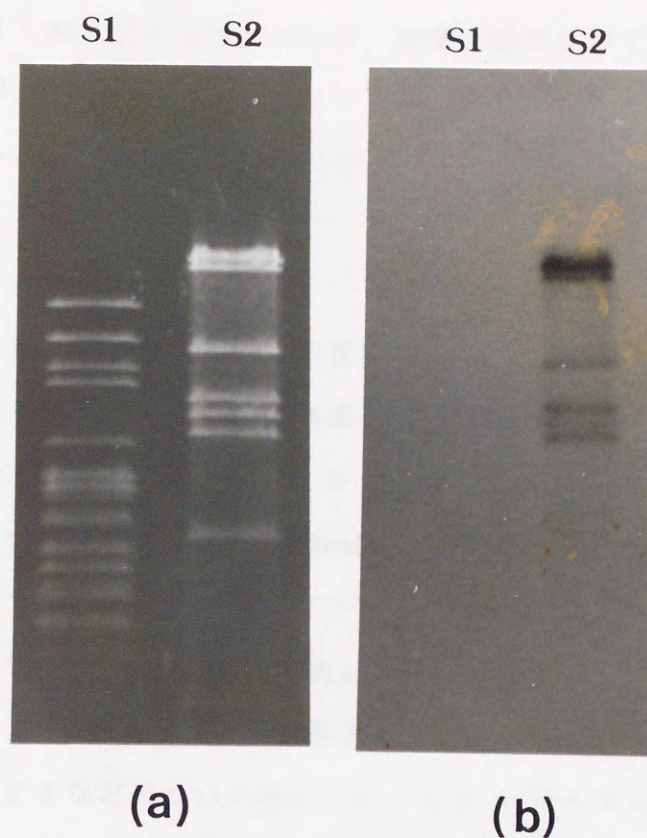


Fig. 18. Detection of homologous region in DNAs between S1 and S2 phages.

DNAs digested with Acc I were electrophoresed in 1% agarose gel slabe and transferred to a nitrocellulose filter. Hybridization was carried out with the digoxigenin-11-dUTP-labelled S2 DNA digested with Acc I as a probe.

(a) Agarose gel electrophoresis of digested DNAs.

(b) Southern blot of the same gel probed with Acc I-digested S2 DNA.



ファージゲノムの相同性について検討したところ、両ファージのゲノムには相同性がなく、互いに遺伝的に異なっていることが分かった。S 1 および S 2 ファージは、発酵工場において分離したものであるが、以上の結果は、両ファージの起源が明らかに違うことを示している。

#### 8. 小括

S 1 および S 2 ファージの核酸について検討した、

両ファージの核酸は、2本鎖DNAであった。その塩基成分は、通常のグアニン、アデニン、シトシンおよびチミン4つの塩基からなっていた。S 1 DNAの $T_m$ は82℃であって、S 2 DNAのそれは85℃であった。DNAのグアニン-シトシン含量は、S 1 DNAで約31%、S 2 DNAでは約38%であった。S 1 および S 2 DNAに40種類のII型制限酵素を作用させて、切断力所の数、断片の大きさなどについて検討した。S 1 DNAは13種類、S 2 DNAは14種類の制限酵素によって切断された。DNAの大きさは、S 1 DNAで約52 kbp、S 2 DNAでは約49 kbpであった。サザンブロットハイブリダイゼーション法で検討したが、両ファージのゲノムには相同性がなく、遺伝的に異なるファージであることが分かった。



## 第 7 章      ファージの蛋白質

### 1. 緒言

ファージ粒子は、前章で述べたように、核酸と蛋白質からなっているが、含量は蛋白質の方が多く、一般に50%以上である。

ファージの蛋白質は、構造的にいく種類かに分けられるが、それぞれ、宿主菌の蛋白質とは関連がなく、また特殊なアミノ酸も含有していない。

### 2. ファージの蛋白質

S 1 および S 2 ファージの構造蛋白質について知るために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動のパターンはFig. 19 に示す。

S 1 ファージの場合、主なバンドが3本、そのほか少なくとも11本のバンドが観察された。主なバンドは、大きい順に、85、61、37キロダルトン(kD)、そのほかのバンドは、大きい順に、66、64、42、39、35、29、27、26、24、19、14 kDであった。

S 2 ファージの場合、主なバンドが3本、そのほか少なくとも10本のバンドが観察された。主なバンドは、大きい順に、38、37、29 kD、そのほかのバンドは、大きい順に、68、66、61、39、25、22、20、18、15、14 kDであった。

以上の結果は、S 1 ファージと S 2 ファージの構造蛋白質が相違することを示している。



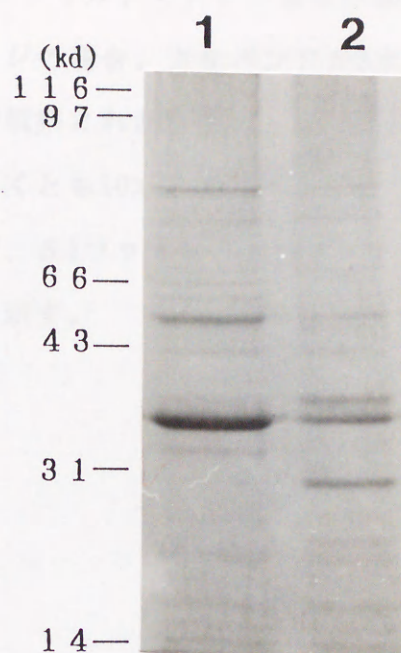


Fig. 19. Patterns of degradation products of S-phage structural proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Purified phages ( $2 \times 10^{10}$  PFU/ml) were disrupted by boiling in 63 mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol (pH 6.8) and loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out at 50 V for 3~4 hr.

1, Phage S1; 2, Phage S2.



### 3. 小括

S1およびS2ファージの構造蛋白質について知るために、  
SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で検討した。

S1ファージの場合、主なバンドが3本、そのほか少なくとも11本のバンドが観察された。S2ファージの場合、主なバンドが3本、そのほか少なくとも10本のバンドが観察された。

このことは、S1ファージとS2ファージの構造蛋白質が相違していることを示す。



## 第8章 ファージに対するオルト フェニルフェノールの 作用

### 1. 緒言

著者の研究室では、細菌利用発酵工業におけるファージの防御を目的として、無毒性ないし低毒性の化学物質のファージに対する作用について一連の研究が行われている(22)。

食品添加物の保存料については、これまでに、安息香酸(23、24)、サリチル酸(23、24)、ソルビン酸(23、24)、デヒドロ酢酸(23~25)、プロピオン酸(24、25)、パラオキシ安息香酸エステル類(23、24、26)について研究されている。

オルトフェニルフェノール(OPP)は、保存料として公定されていて、グレープフルーツ、レモン、オレンジなどの柑橘類の腐敗防止に使用されているが、ファージに対する作用については研究されていなかった。そこで、OPPのS1およびS2ファージに対する作用について検討した。

### 2. 宿主菌に対するオルトフェニルフェノールの作用

まず、S1およびS2ファージの宿主菌である *Escherichia coli* K-12に対するOPPの作用について検討した。

Fig. 20 に、培養濁度(生育)に及ぼすOPPの影響を示す。 $1 \times 10^{-4}$  M付近から影響がみられ始め、 $6 \times 10^{-4}$  Mで生育は完全に阻害された。



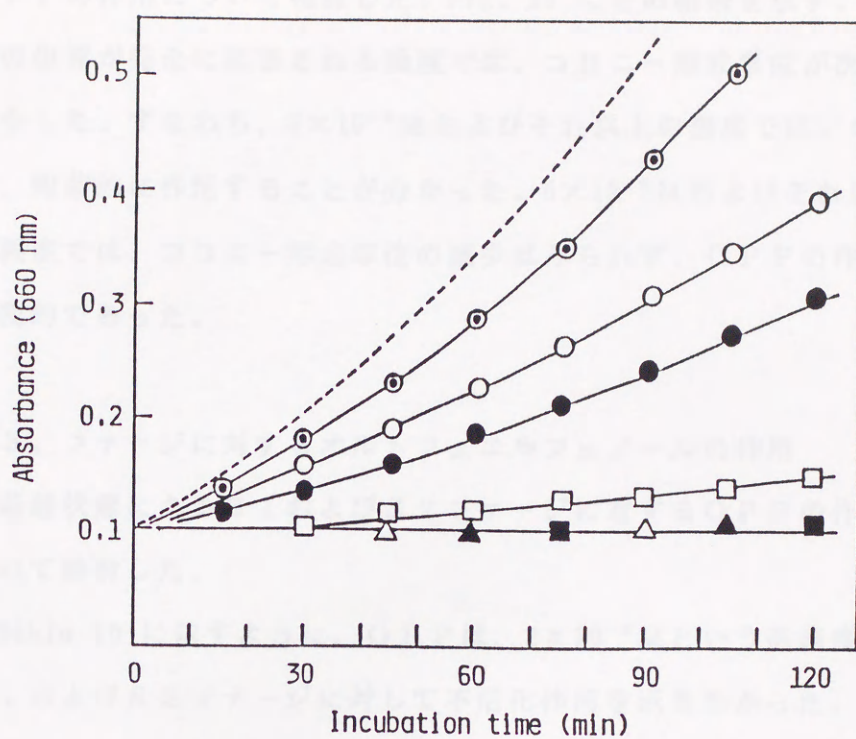


Fig. 20 Effect of *o*-phenylphenol on cellular growth of *Escherichia coli* K-12.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were incubated in nutrient broth with OPP at  $37^\circ\text{C}$ . Concentrations of OPP (M) :  
 ..., 0; ⊙,  $1 \times 10^{-4}$ ; ○,  $2 \times 10^{-4}$ ; ●,  $4 \times 10^{-4}$ ;  
 □,  $5 \times 10^{-4}$ ; ■,  $6 \times 10^{-4}$ ; △,  $8 \times 10^{-4}$ ; ▲,  $1 \times 10^{-3}$ .



この実験において、培養液から経時的に試料を採り、コロニー形成単位の計数を行った。すなわち、菌のコロニー形成能に対するOPPの作用について検討した。Fig. 21 にその結果を示す。菌の生育が完全に阻害される濃度では、コロニー形成単位が次第に減少した。すなわち、 $6 \times 10^{-4}$  Mおよびそれ以上の濃度では、OPPは、殺菌的に作用することが分かった。 $5 \times 10^{-4}$  Mおよびそれ以下の濃度では、コロニー形成単位の減少はみられず、OPPの作用は静菌的であった。

### 3. ファージに対するオルトフェニルフェノールの作用

遊離状態にあるS1およびS2ファージに対するOPPの作用について検討した。

Table 10 に示すように、OPPは、 $2 \times 10^{-3}$  Mという高濃度でも、S1およびS2ファージに対して不活化作用を示さなかった。

### 4. ファージの吸着に対するオルトフェニルフェノールの作用

S1およびS2ファージの宿主菌細胞への吸着に対するOPPの作用について検討した。

Table 11 に示すように、OPPは、 $2 \times 10^{-3}$  Mという高濃度でも、S1およびS2ファージの吸着を阻害しなかった。

### 5. ファージの増殖に対するオルトフェニルフェノールの作用

S1およびS2ファージの増殖に対するOPPの作用について、一段階増殖実験法で検討した。結果はFig. 22 に示す。

S1ファージでは、宿主菌の殺菌的濃度である $6 \times 10^{-4}$  Mおよび



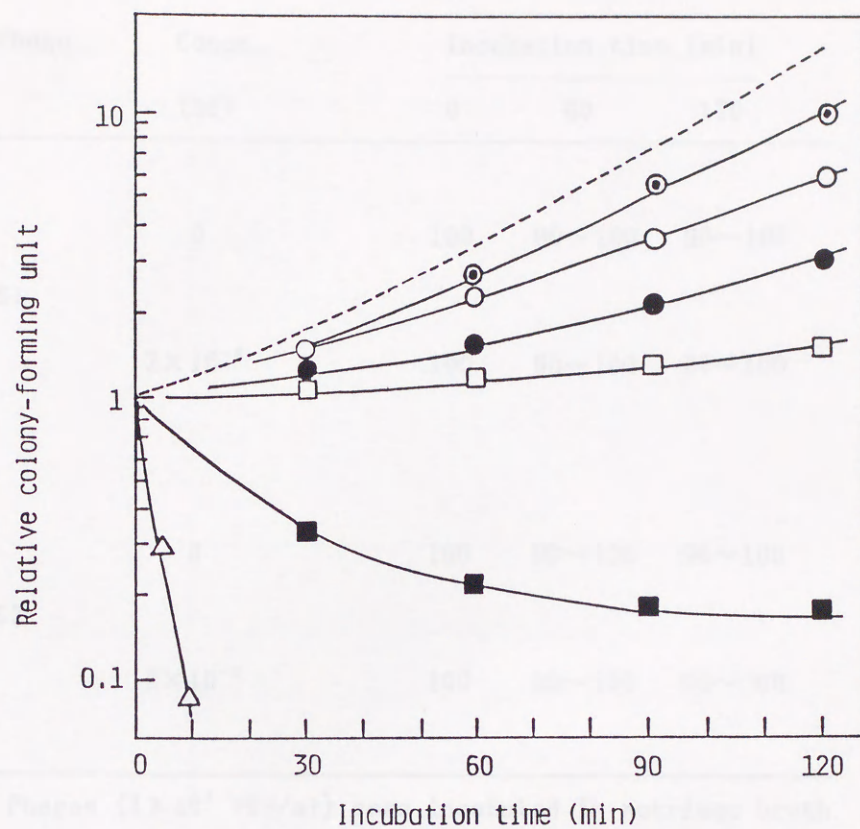


Fig. 21 Effect of *o*-phenylphenol on colony-forming ability of *Escherichia coli* K-12.

See the legend to Fig. 20. The initial number of cells is represented as 1.



Table 10. Effects of o-phenylphenol on free S-phages

Phage	Concn. (M)	Survival (%)		
		Incubation time (min)		
		0	60	120
S1	0	100	90~100	90~100
	$2 \times 10^{-3}$	100	90~100	90~100
S2	0	100	90~100	90~100
	$2 \times 10^{-3}$	100	90~100	90~100

Phages ( $4 \times 10^7$  PFU/ml) were incubated in nutrient broth (pH 6.0) with O P P at 37°C.



Table 11. Effects of o-phenylphenol on adsorption of S-phages

Phage	Concn. (M)	Phage adsorbed (%)
S1	0	90
	$2 \times 10^{-3}$	90
S2	0	25
	$2 \times 10^{-3}$	25

Bacteria ( $2 \times 10^8$  cells/ml) were mixed with phage ( $2 \times 10^8$  PFU/ml) and allowed to adsorb phages for 3 min at 37°C. OPP was added just prior to adsorption.

The unadsorbed phages were assayed by a 100-fold dilution of the adsorption mixture, following the sedimentation of adsorbed phages by centrifugation.

Input of phages is represented as 100%.



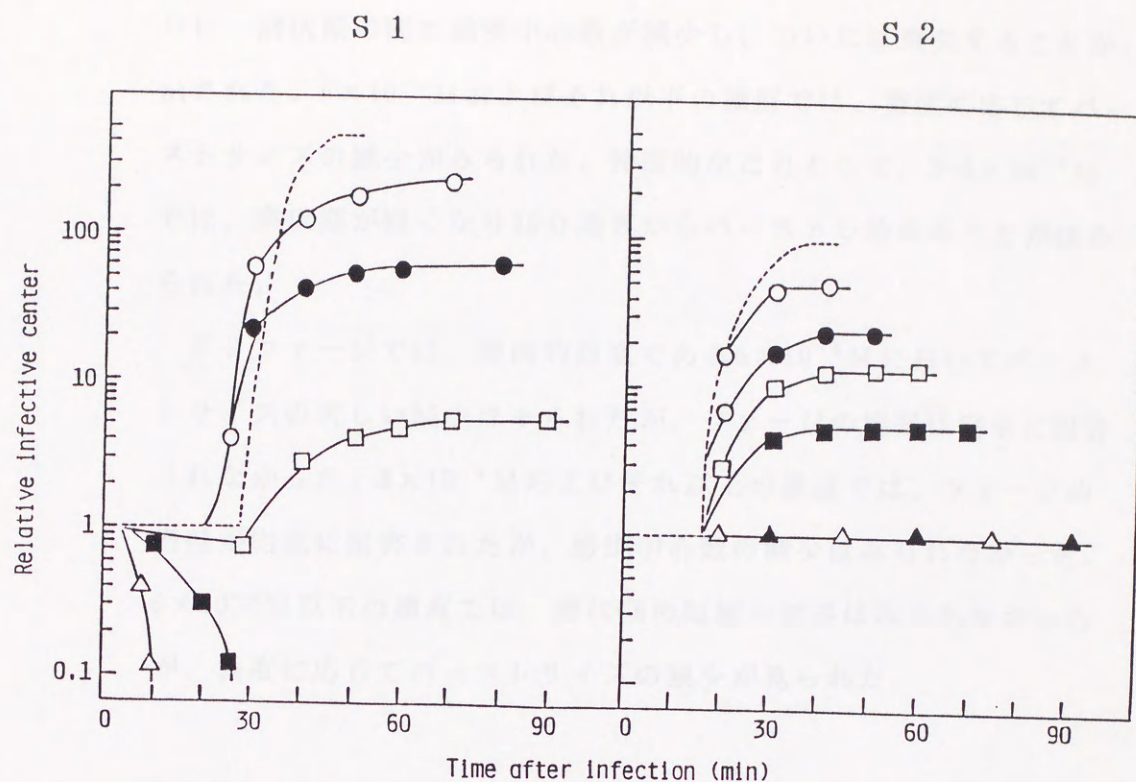


Fig. 22. Effects of *o*-phenylphenol on one-step growth of S-phages.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were infected with phage (m.o.i., ca. 0.1). After 3 min of adsorption and 2 min of antiserum treatment, the infected cells were diluted 1:2000 into nutrient broth with OPP and incubated at  $37^\circ\text{C}$ . The number of initial infected cells is represented as 1. Concentrations of OPP (M) : see the legend to Fig. 20.



それ以上の濃度において、ファージの増殖は完全に阻害された。さらに、潜伏期の間に感染中心数が減少し、ついには喪失することが示された。 $5 \times 10^{-4}$  M およびそれ以下の濃度では、濃度に応じてバーストサイズの減少がみられた。特徴的なこととして、 $2 \sim 4 \times 10^{-4}$  M では、潜伏期が短くなり20分過ぎからバーストし始めることが認められた。

S 2 ファージでは、殺菌的濃度である $6 \times 10^{-4}$  Mにおいてバーストサイズの著しい減少はみられたが、ファージの増殖は完全に阻害されなかった。 $8 \times 10^{-4}$  M およびそれ以上の濃度では、ファージの増殖が完全に阻害されたが、感染中心数の減少はみられなかった。 $6 \times 10^{-4}$  M 以下の濃度では、潜伏期の短縮や延長はみられなかったが、濃度に応じてバーストサイズの減少が見られた。

#### 6. ファージ感染菌の溶菌に対するオルトフェニルフェノールの作用

S 1 および S 2 ファージ感染菌の溶菌に対するOPPの作用について検討した。

Fig. 23 に示すように、S 1 ファージ感染菌では、 $8 \times 10^{-4}$  M およびそれ以上の濃度において、溶菌は完全に阻害された。しかし、低濃度( $2 \sim 4 \times 10^{-4}$  M)のOPPでは、約20分のラグの後にファージ感染菌が早期溶菌を起すことが認められた。 $6 \times 10^{-4}$  M でも早期溶菌がみられたが、溶菌の程度は大きいものではなかった。

S 2 ファージ感染菌では、このような早期溶菌は認められなかった。すなわち、低濃度では溶菌に影響がみられず、高濃度では溶菌が阻害される傾向がみられた。



S 1

S 2

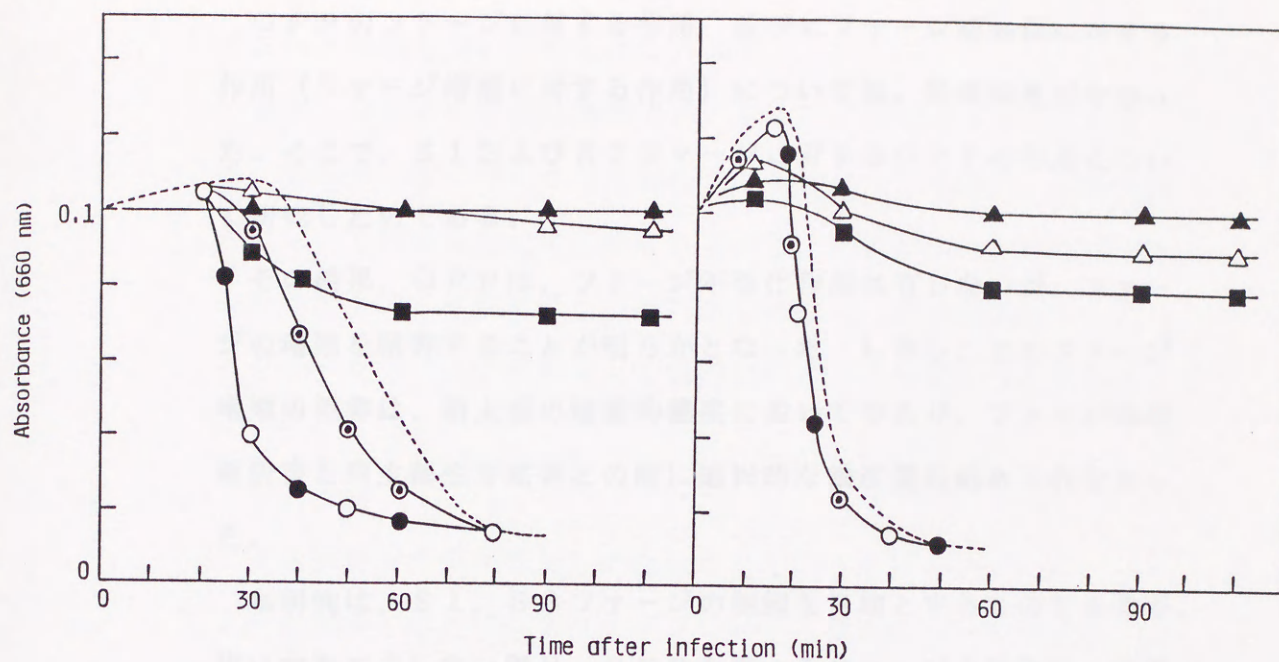


Fig. 23. Effects of *o*-phenylphenol on lysis of phage-infected cells.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were infected with phage (m.o.i., 10), and the infected cells were incubated with OPP at 37°C. Concentrations of OPP (M) : see the legend to Fig. 20.



## 7. 考察

OPPのファージに対する作用、並びにファージ感染菌に対する作用（ファージ増殖に対する作用）については、従来知見がなかった。そこで、S1およびS2ファージに対するOPPの作用について研究したのである。

その結果、OPPは、ファージ不活化作用は有しないが、ファージの増殖を阻害することが明らかとなった。しかし、そのファージ増殖の阻害は、宿主菌の殺菌的濃度においてであり、ファージの増殖阻害と宿主菌生育阻害との間に選択的な濃度差は認められなかった。

本研究は、S1、S2ファージの制御を目的とするものであるが、使い方を工夫しない限り、OPPを用いるファージの制御は、実用上の価値がほとんどないと考えられる。

しかしながら、S1ファージ感染菌細胞の溶菌に対するOPPの作用には興味深いものがある。すなわち、S1ファージの溶菌には、次の2つの特徴がある。(1) 溶菌は、OPP添加後直ちに起こらず、約20分のラグが必要であるが、通常約30分という溶菌開始時間よりは早期に起こる。(2) 溶菌を起こすOPPの濃度は、高濃度(殺菌的濃度)ではなく低濃度(菌の生育をある程度許す濃度)である。

S1ファージの潜伏期は約28分であるが、OPPによる溶菌が起こり始めるのは約20分である。溶菌が起こる低濃度では、速度は遅いがファージ増殖のプロセスは進行しており、ファージエンドリジンが細胞内に蓄積していると考えられる。したがって、溶菌がOPP添加後すぐに起こらず、潜伏期の後半になって始めて起こる



のは、ファージエンドリジンの働きによる酵素的なものであると考えるのが妥当である。OPPの高濃度で溶菌が阻害されるのは、ファージ増殖のプロセスが進行せず、したがって、ファージエンドリジンが蓄積しないためと考えられる。

なお、OPPの殺菌的濃度でS1ファージの増殖が阻害されるとき、感染中心数の減少がみられた。S1ファージの場合、殺菌的濃度において溶菌は完全に阻害されるので、この濃度における感染中心数の減少は、早期溶菌によるものではなく、感染菌細胞内におけるファージゲノムの喪失ないし複製阻害によるものと考えられる。

#### 8. 小括

食品添加物の保存料として公定されているオルトフェニルフェノールのS1およびS2ファージに対する作用について研究し、次のことが分かった。

(1) 宿主菌に対して $6 \times 10^{-4}$  Mで殺菌的に作用する。(2)  $2 \times 10^{-3}$  Mという高濃度において、ファージを不活化しない。(3) また、ファージの吸着を阻害しない。(4) 一方、ファージの増殖を阻害する。(5) S1ファージでは、低濃度( $2 \sim 4 \times 10^{-4}$  M)でファージ感染菌の早期溶菌を誘起する。(6) S2ファージでは、早期溶菌を誘起しない。



## 第9章 その他のファージに対する オルトフェニルフェ ノールの作用

### 1. 緒言

前章において、OPPがS1ファージ感染菌の早期溶菌を誘起することを見出した。

本章では、ファージ感染菌に対するOPPの早期溶菌誘起作用が、他の菌-ファージ系でもみられる一般的なものかどうかを知るために、*Escherichia coli*の5つのファージ系、*Bacillus subtilis*の2つのファージ系および *Lactobacillus casei*のJ1ファージ系を用いて研究した結果を述べる。

### 2. 宿主菌に対するオルトフェニルフェノールの作用

ファージの宿主菌である*Escherichia coli*のBとC、*Bacillus subtilis* Yおよび *Lactobacillus casei* S1に対するOPPの作用について検討した。

Fig. 24 に、*Escherichia coli* Bに対するOPPの作用を示す。図の左側に示すように、培養濁度(生育)に及ぼす影響は、 $1 \times 10^{-4}$  M付近からみられ始め、 $8 \times 10^{-4}$  Mで生育は完全に阻害された。しかし、この生育阻害濃度およびより高濃度において、培養濁度の減少(溶菌)はみられなかった。図の右側に示すように、菌の生育が完全に阻害される濃度では、コロニー形成単位が次第に減少した。すなわち、 $8 \times 10^{-4}$  Mおよびそれ以上の濃度では、OPPは、殺菌的に作用することが示された。それ以下の濃度では、コロニー形成単



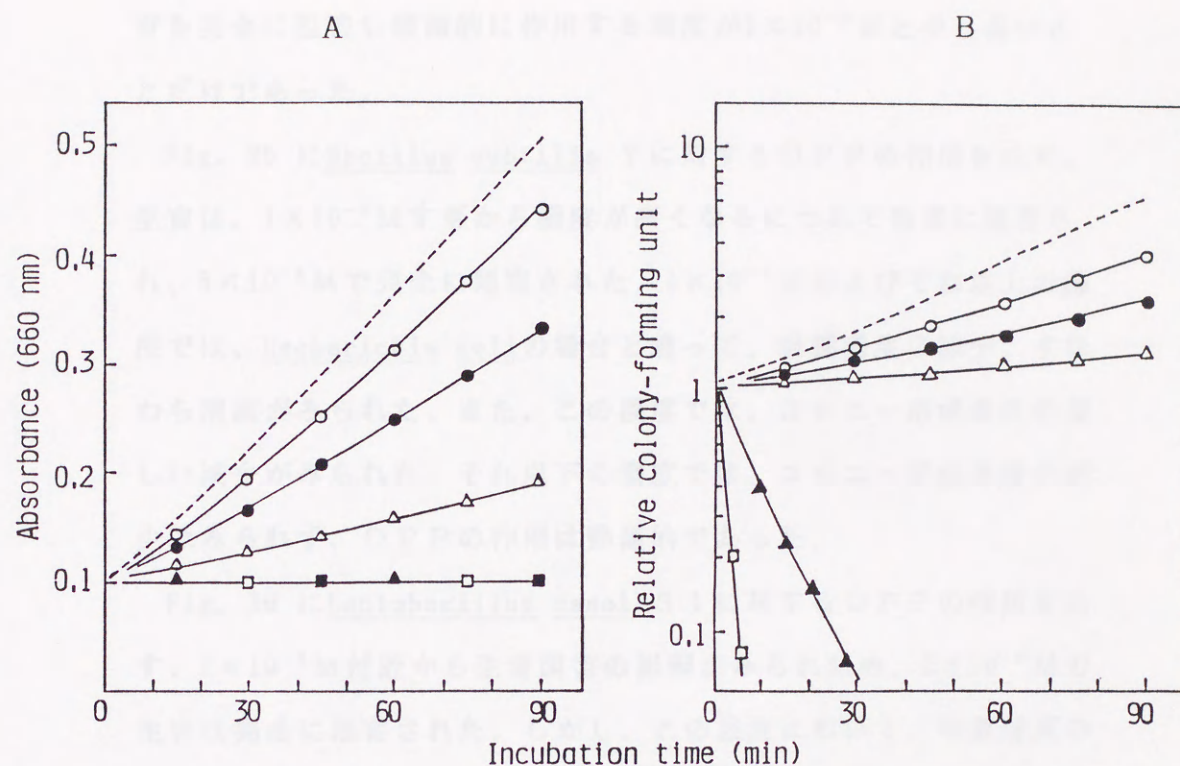


Fig. 24 Effects of *o*-phenylphenol on cellular growth and colony-forming ability of *Escherichia coli* B.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were incubated in nutrient broth with OPP at 37°C. The initial number of cells is represented as 1. Concentrations of OPP (M) : ---, 0; ○,  $2 \times 10^{-4}$ ; ●,  $4 \times 10^{-4}$ ; △,  $6 \times 10^{-4}$ ; ▲,  $8 \times 10^{-4}$ ; □,  $1 \times 10^{-3}$ ; ■,  $2 \times 10^{-3}$ .

A, Cellular growth; B, Colony-forming ability.



位の減少はみられず、OPPの作用は静菌的であった。

また、*Escherichia coli* Cに対するOPP作用について検討した。*Escherichia coli* Bとの違いは、 $8 \times 10^{-4}$  Mでは静菌的で、生育を完全に阻害し殺菌的に作用する濃度が $1 \times 10^{-3}$  Mと少し高いことだけであった。

Fig. 25 に*Bacillus subtilis* Yに対するOPPの作用を示す。生育は、 $1 \times 10^{-4}$  Mすぎから濃度が高くなるにつれて次第に阻害され、 $8 \times 10^{-4}$  Mで完全に阻害された。 $1 \times 10^{-3}$  Mおよびそれ以上の濃度では、*Escherichia coli*の場合と違って、培養濁度の減少、すなわち溶菌がみられた。また、この濃度では、コロニー形成単位の著しい減少がみられた。それ以下の濃度では、コロニー形成単位の減少はみられず、OPPの作用は静菌的であった。

Fig. 26 に*Lactobacillus casei* S 1に対するOPPの作用を示す。 $2 \times 10^{-4}$  M付近から生育阻害の影響がみられ始め、 $2 \times 10^{-3}$  Mで生育は完全に阻害された。しかし、この濃度において、培養濁度の減少(溶菌)はみられなかった。なお、この濃度ではコロニー形成単位が急速に減少し、OPPは、殺菌的に作用することが示された。 $1 \times 10^{-3}$  M以下の濃度では、コロニー形成単位の減少はみられず、OPPの作用は静菌的であった。

### 3. ファージに対するオルトフェニルフェノールの作用

遊離状態にある8種のファージに対するOPPの直接作用について検討した。その結果、Table 12 に示すように、OPPは、 $2 \times 10^{-3}$  Mという高濃度でもファージに対して不活化作用を示さなかった。



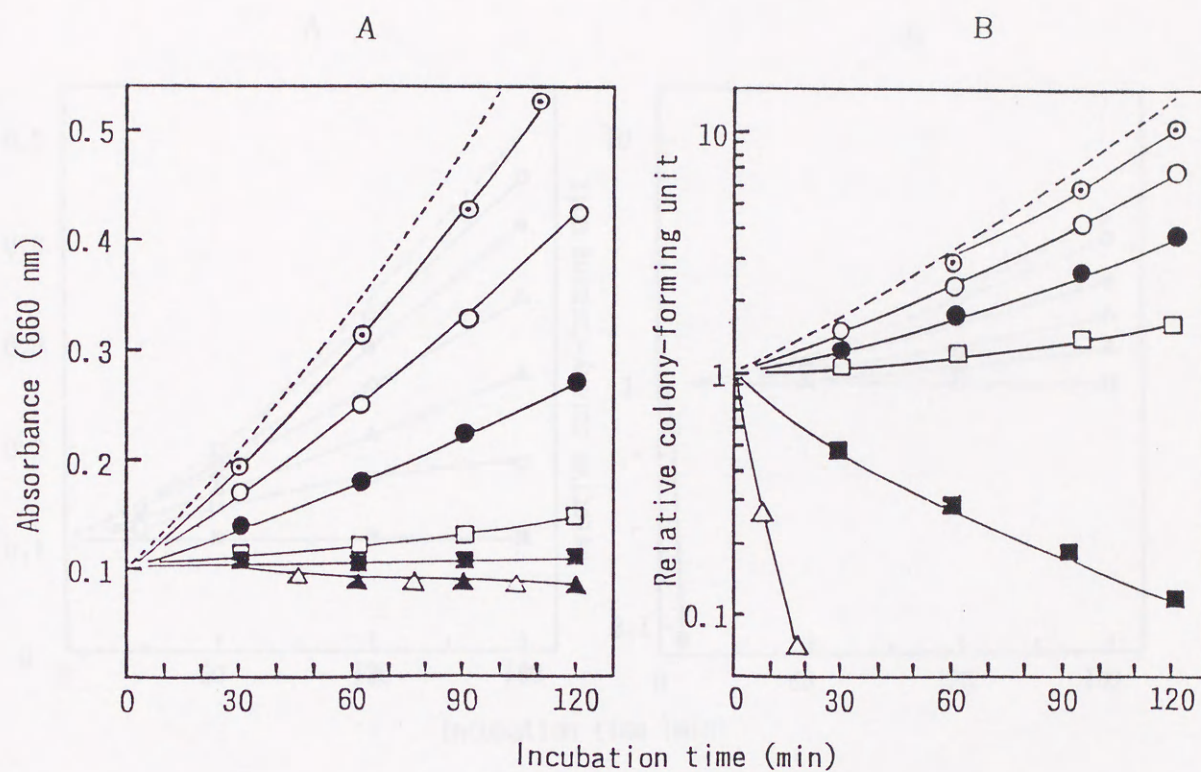


Fig. 25 Effects of *o*-phenylphenol on cellular growth and colony-forming ability of *Bacillus subtilis* Y.

See the legend to Fig. 24. Concentrations of OPP (M) :

---, 0; ,  $\odot$   $1 \times 10^{-4}$ ;  $\circ$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ;  $\bullet$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ;  $\square$ ,  $6 \times 10^{-4}$ ;

$\blacksquare$ ,  $8 \times 10^{-4}$ ;  $\triangle$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ;  $\blacktriangle$ ,  $2 \times 10^{-3}$ .

A, Cellular growth; B, Colony-forming ability.



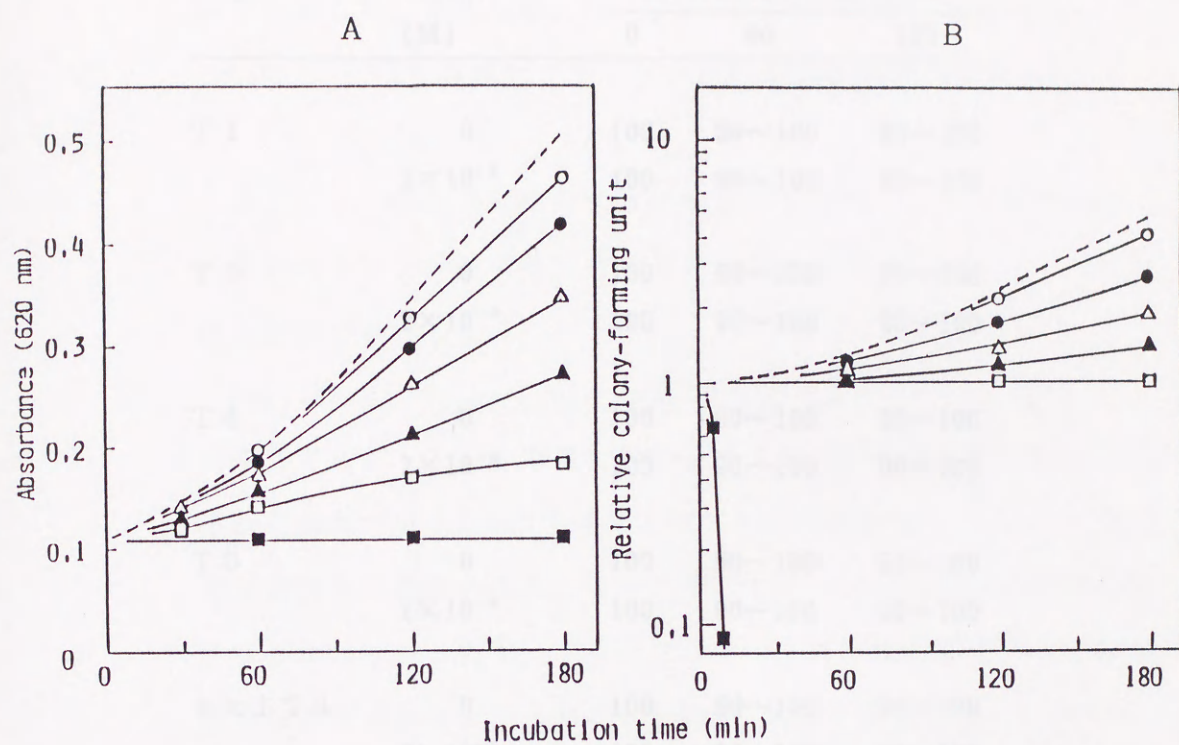


Fig. 26 Effects of *o*-phenylphenol on cellular growth and colony-forming ability of *Lactobacillus casei* S1.

See the legend to Fig. 24, but MRT broth was used instead of nutrient broth.

A, Cellular growth; B, Colony-forming ability.



Table 12. Effects of *o*-phenylphenol on free phages

Phage	Concn. (M)	Survival (%)		
		Incubation time (min)		
		0	60	120
T 1	0	100	90~100	90~100
	$2 \times 10^{-3}$	100	90~100	90~100
T 3	0	100	90~100	90~100
	$2 \times 10^{-3}$	100	90~100	90~100
T 4	0	100	90~100	90~100
	$2 \times 10^{-3}$	100	90~100	90~100
T 5	0	100	90~100	90~100
	$2 \times 10^{-3}$	100	90~100	90~100
$\phi$ x 174	0	100	90~100	90~100
	$2 \times 10^{-3}$	100	90~100	90~100
M 2	0	100	90~100	90~100
	$2 \times 10^{-3}$	100	90~100	90~100
S P O 1	0	100	90~100	90~100
	$2 \times 10^{-3}$	100	90~100	90~100
J 1	0	100	90~100	90~100
	$2 \times 10^{-3}$	100	90~100	90~100

See the legend to Table 10, but MRT broth was used for phage J1.



#### 4. ファージの吸着に対するオルトフェニルフェノールの作用

8種のファージの宿主菌細胞への吸着に対するOPPの作用について検討した。その結果、Table 13に示すように、OPPは、 $2 \times 10^{-3}$  Mという高濃度でもファージの吸着を阻害しなかった。

#### 5. ファージの増殖に対するオルトフェニルフェノールの作用

8種のファージの増殖に対するOPPの作用について、一段階増殖実験法で検討した。

Fig. 27に、*Escherichia coli* Bを宿主とするT1、T3、T4、T5ファージの増殖に対するOPPの作用を示す。宿主菌の殺菌的濃度である $8 \times 10^{-4}$  Mおよびそれ以上において、ファージの増殖は完全に阻害された。T1とT3ファージでは感染中心数の減少はみられなかったが、T4とT5ファージでは比較的ゆるやかな感染中心数の減少がみられた。 $8 \times 10^{-4}$  M以下の濃度では、いずれのファージとも、潜伏期の延長とパーストサイズの減少がみられた。なお、宿主菌の生育に影響しない $1 \times 10^{-4}$  M以下の濃度では、ファージ増殖に対する影響はみられなかった。

Fig. 28に、*Escherichia coli* Cを宿主とする $\phi$  x 174ファージの増殖に対するOPPの作用を示す。殺菌的濃度の $1 \times 10^{-3}$  Mおよびそれ以上において、ファージの増殖は完全に阻害されたが、感染中心数の減少はみられなかった。 $8 \times 10^{-4}$  M以下の濃度では、T系ファージの場合と同様であった。

Fig. 29に、*Bacillus subtilis* Yを宿主とするM2、SPO1ファージの増殖に対するOPPの作用を示す。宿主菌の生育が完全



Table 13. Effects of *o*-phenylphenol on adsorption of phages

Phage	Concn. (M)	Phage adsorbed (%)
T 1	0	90
	$2 \times 10^{-3}$	90
T 3	0	90
	$2 \times 10^{-3}$	90
T 4	0	90
	$2 \times 10^{-3}$	90
T 5	0	90
	$2 \times 10^{-3}$	90
$\phi$ x 174	0	90
	$2 \times 10^{-3}$	90
M 2	0	90
	$2 \times 10^{-3}$	90
S P O 1	0	90
	$2 \times 10^{-3}$	90
J 1	0	95
	$2 \times 10^{-3}$	95

See the legend to Table 11, but MRT broth was used for phage J1.



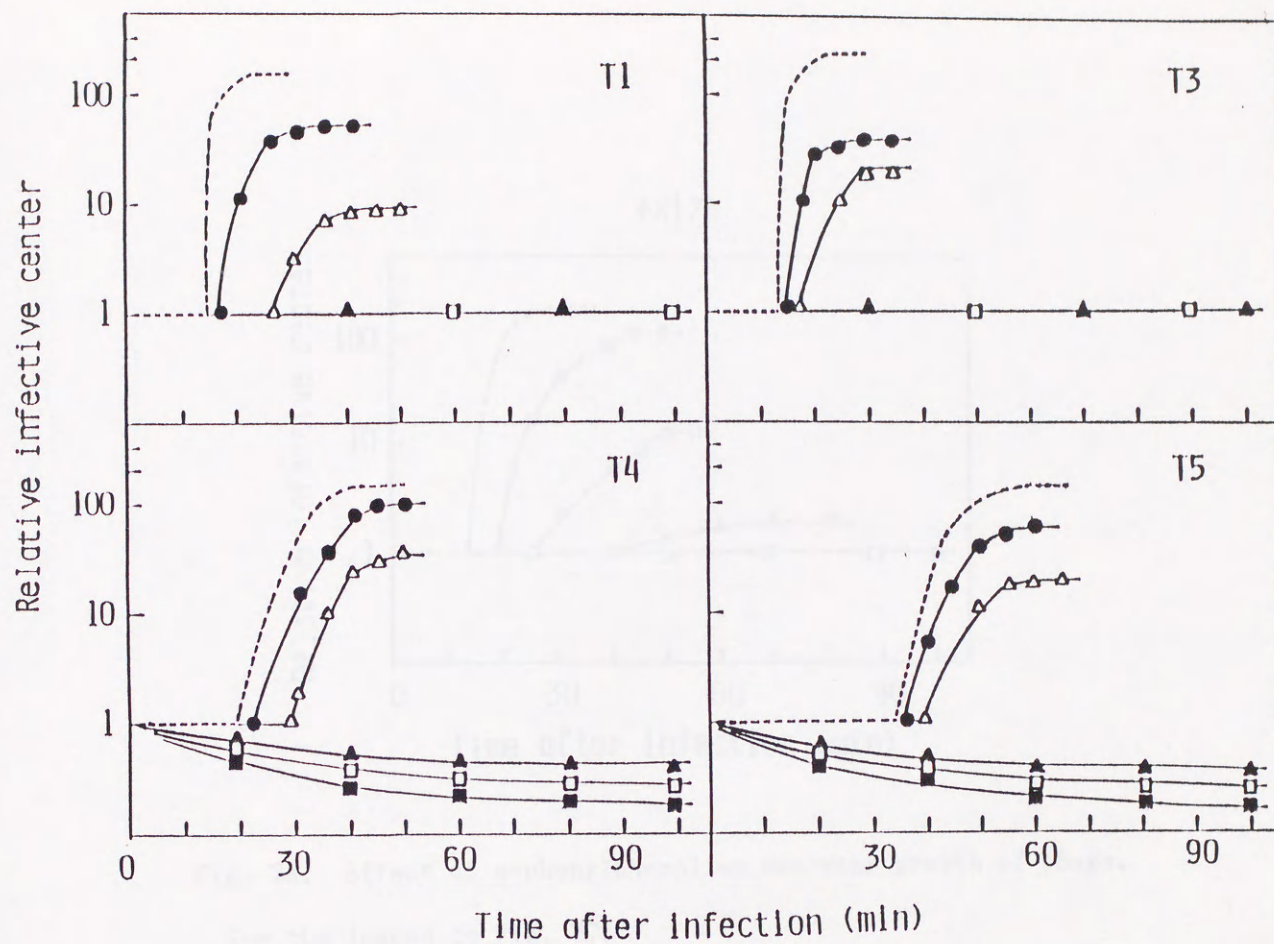


Fig. 27. Effects of *o*-phenylphenol on one-step growth of phages.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8/\text{ml}$ ) were infected with phage (m.o.i., ca. 0.1). After 3 min of adsorption and 2 min of antiserum treatment, the infected cells were diluted 1:2000 into nutrient broth with OPP and incubated at  $37^\circ\text{C}$ . The number of initial infected cells is represented as 1. Concentrations of OPP (M) : see the legend to Fig. 24.



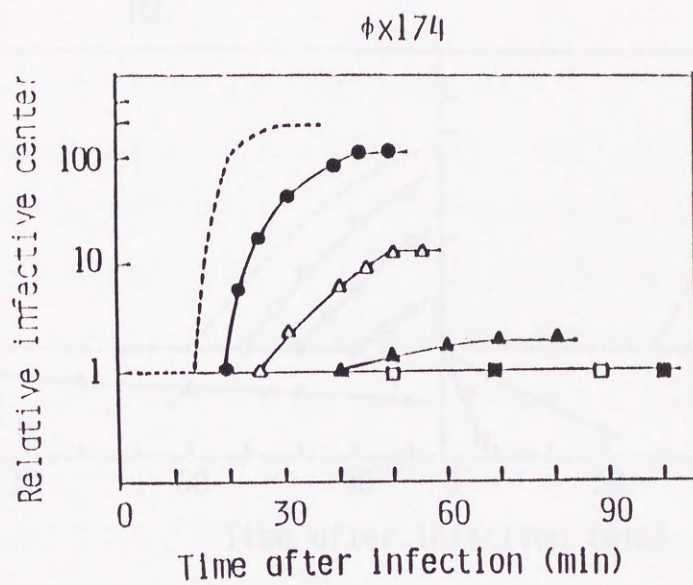


Fig. 28. Effect of o-phenylphenol on one-step growth of phage.

See the legend to Fig. 27.



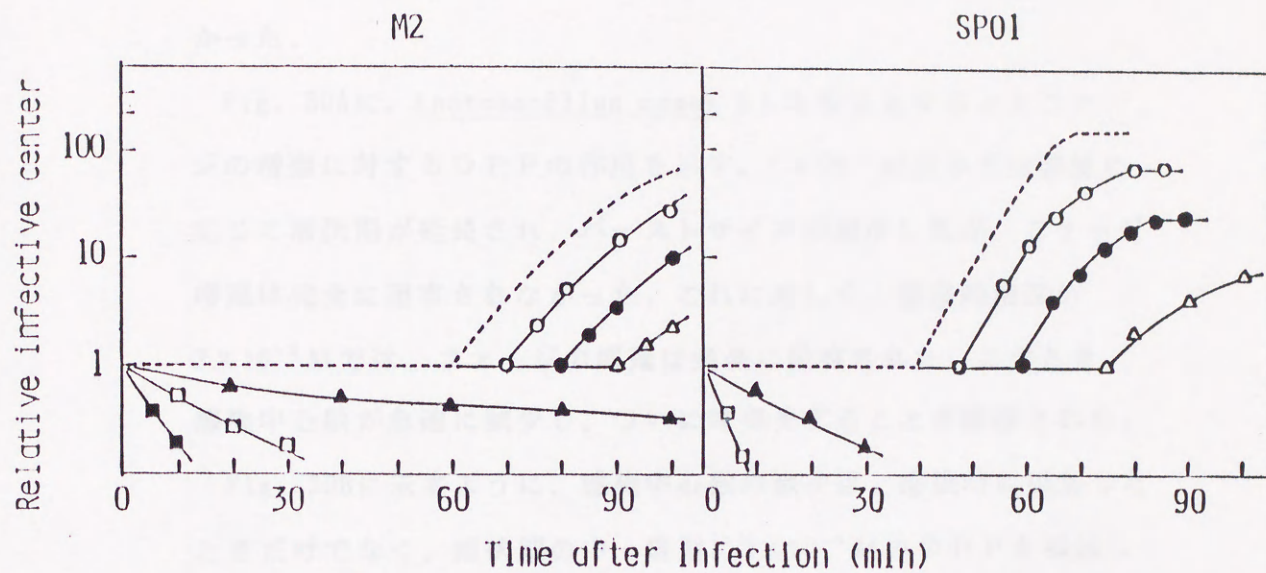


Fig. 29. Effects of *o*-phenylphenol on one-step growth of phages.

See the legend to Fig. 27.



に阻害される $8 \times 10^{-4}$  Mおよびそれ以上の濃度において、ファージの増殖は完全に阻害された。また感染中心数の減少がみられたが、同じ濃度では、S P O 1 ファージの方が著しかった。 $8 \times 10^{-4}$  M以下の濃度では、潜伏期の延長とバーストサイズの減少がみられた。 $1 \times 10^{-4}$  M以下の濃度では、ファージ増殖に対する影響はみられなかった。

Fig. 30Aに、*Lactobacillus casei* S1を宿主とするJ 1 ファージの増殖に対するO P Pの作用を示す。 $1 \times 10^{-3}$  M以下では濃度に応じて潜伏期が延長され、バーストサイズが減少したが、ファージ増殖は完全に阻害されなかった。これに対して、殺菌的濃度の $2 \times 10^{-3}$  Mでは、ファージの増殖は完全に阻害された。このとき、感染中心数が急速に減少し、ついには喪失することが観察された。

Fig. 30Bに示すように、感染中心数の減少は、感染時に添加したときだけでなく、潜伏期中・後期に $2 \times 10^{-3}$  MのO P Pを添加したときでも観察された。

#### 6. ファージ感染菌の溶菌に対するオルトフェニルフェノールの作用

8種のファージについて、ファージ感染菌の溶菌に対するO P Pの作用を検討した。

Fig. 31 に、*Escherichia coli* Bを宿主とするT 1、T 3、T 4、T 5 ファージ感染菌の溶菌に対するO P Pの作用を示す。殺菌的濃度の $8 \times 10^{-4}$  Mおよびそれ以上において、T 1とT 3ファージの場合、溶菌は完全に阻害された。これに対して、T 4とT 5ファージでは、O P Pを添加すると直ぐにファージ感染菌の溶菌が



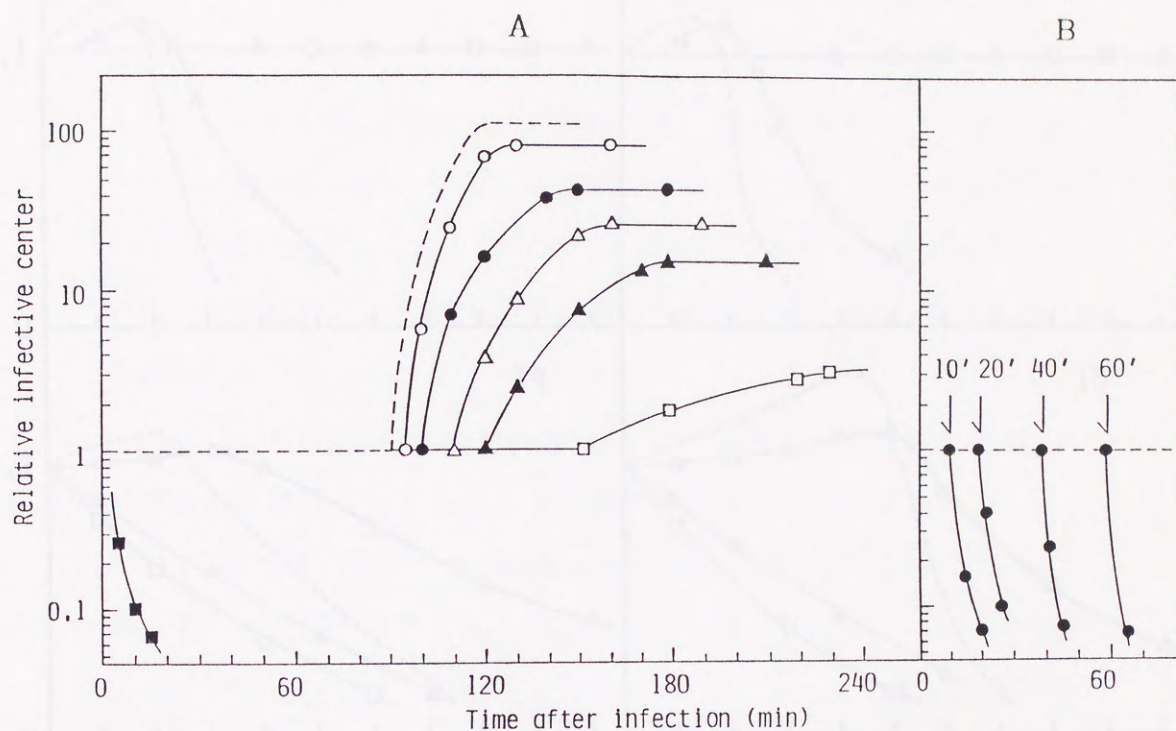


Fig. 30. Effect of *o*-phenylphenol on one-step growth of phage J1.

See the legend to Fig. 27, but MRT broth was used instead of nutrient broth.

A, Different concentrations of OPP were added at the time of infection.

B, OPP ( $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) was added at the times indicated in the figure.



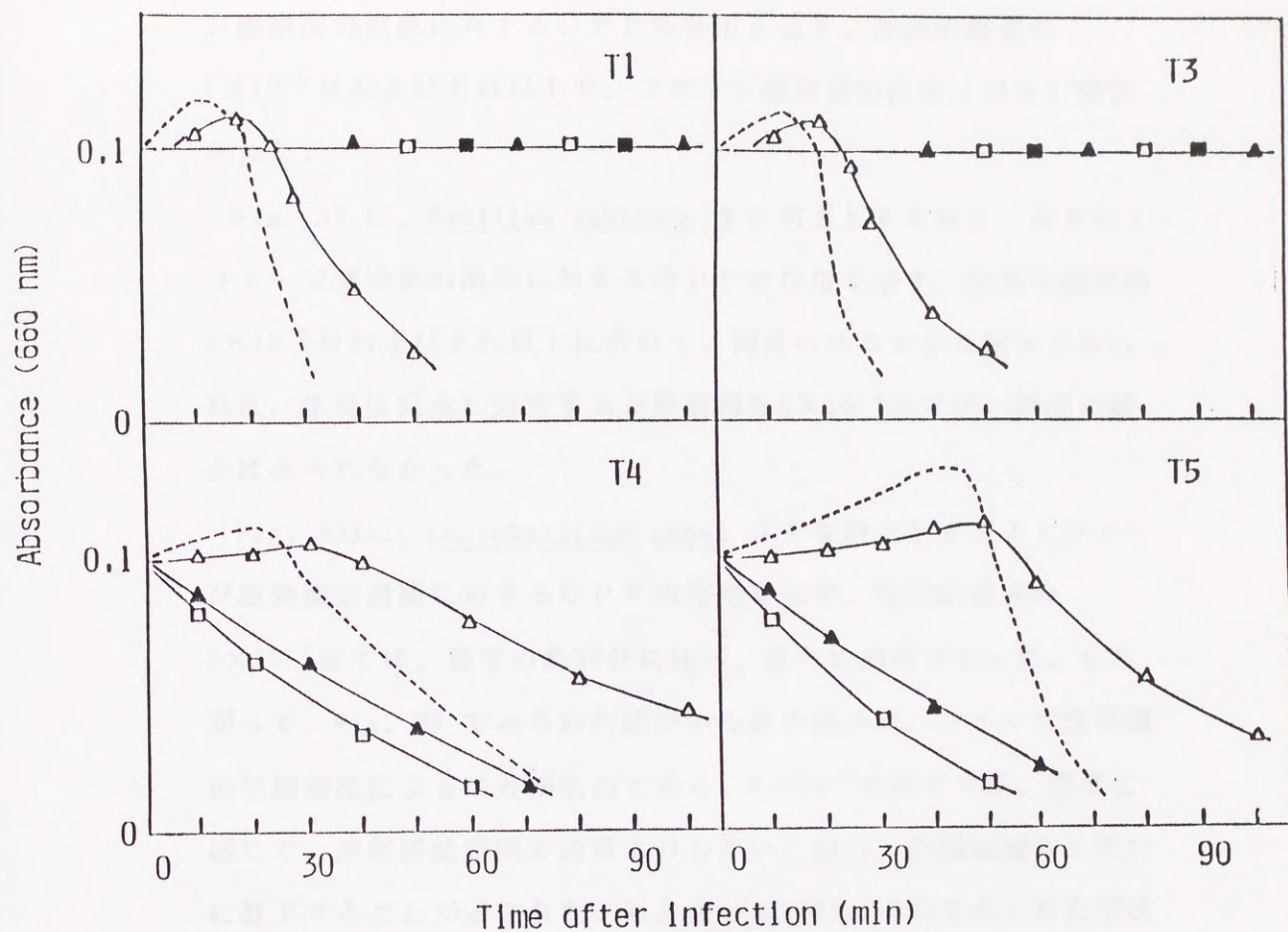


Fig. 31. Effects of *o*-phenylphenol on lysis of phage-infected cells.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were infected with phage (m.o.i., 10) and the infected cells were incubated with OPP at 37°C. Concentrations of OPP (M) : see the legend to Fig. 24.



始まり、数十分以上にわたって続くことが示された。

Fig. 32に、*Escherichia coli* Cを宿主とする $\phi \times 174$ ファージ感染菌の溶菌に対するOPPの作用を示す。殺菌的濃度の $1 \times 10^{-3}$  Mおよびそれ以上で、ファージ感染菌の溶菌は完全に阻害された。

Fig. 33 に、*Bacillus subtilis* Yを宿主とするM2、SPO1ファージ感染菌の溶菌に対するOPPの作用を示す。殺菌的濃度の $1 \times 10^{-3}$  Mおよびそれ以上において、濁度のゆるやかな減少がみられた。生育は完全に阻害するが静菌的な $8 \times 10^{-4}$  Mでは、濁度の減少はみられなかった。

Fig. 34Aに、*Lactobacillus casei* S1を宿主とするJ1ファージ感染菌の溶菌に対するOPPの作用を示す。殺菌的濃度の $2 \times 10^{-3}$  Mでは、通常の約90分に比べ、直ちに溶菌が起った。したがって、Fig. 30 でみられた感染中心数の減少は、ファージ感染菌の早期溶菌によることが明白である。 $8 \times 10^{-4}$  M以下では、濃度に応じて、溶菌開始時間が通常よりしだいに遅れ、溶菌速度もしだいに低下することが示された。したがって、Fig. 30Aでみられた潜伏期の延長は、溶菌開始時間の遅れで説明できる。

Fig. 34Bに、 $2 \times 10^{-3}$  MのOPPを潜伏期中・後期に添加したときの結果を示す。どの時期に添加しても、OPPは、直ちに溶菌を引き起こした。これは、感染中心数の減少が潜伏期のどの時期に添加したときでも観察されるというFig. 30Bの結果と一致している。



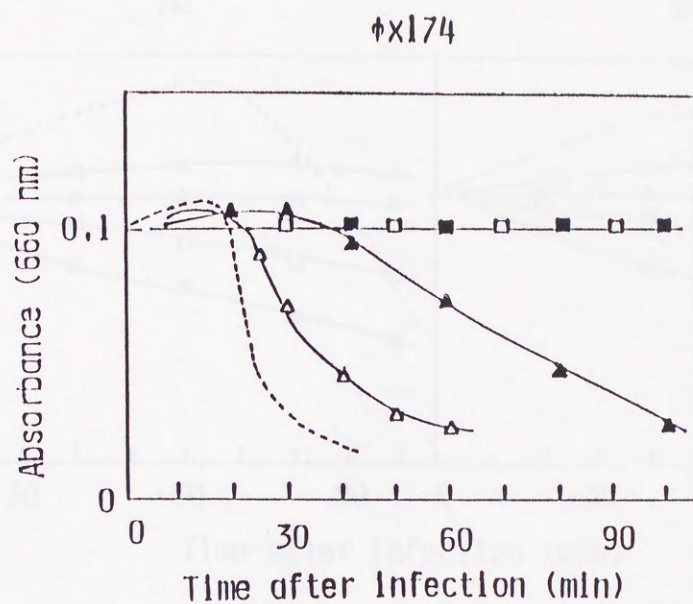


Fig. 32. Effect of o-phenylphenol on lysis of phage-infected cells.

See the legend to Fig. 31.



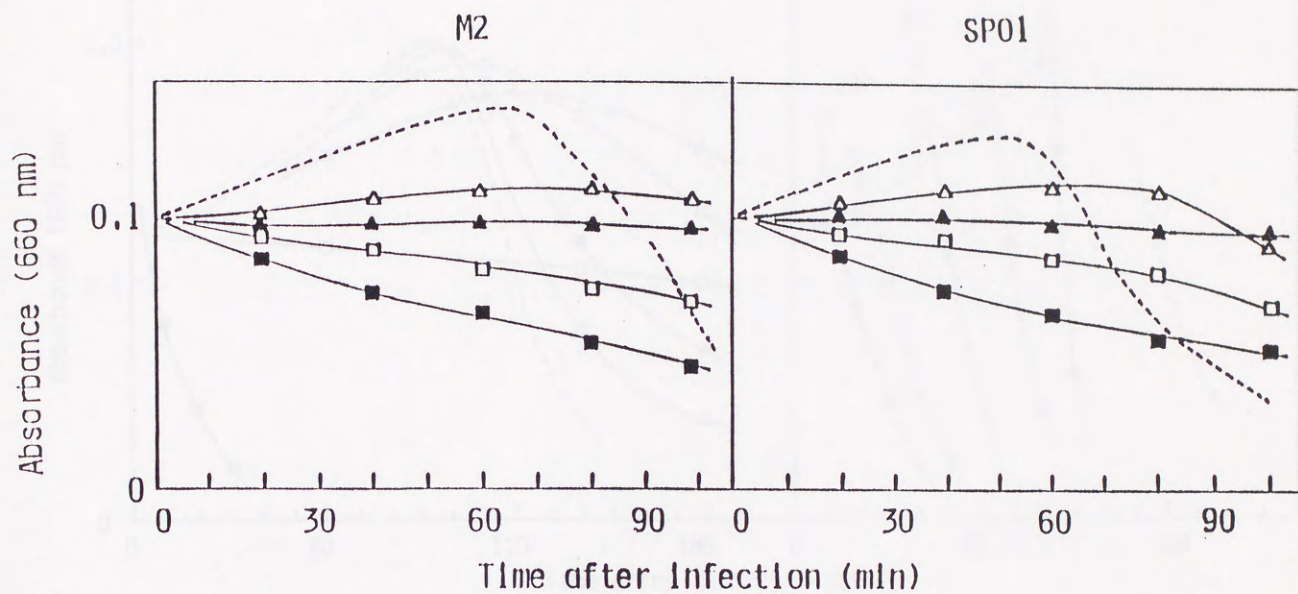


Fig. 33. Effects of o-phenylphenol on lysis of phage-infected cells.

See the legend to Fig. 31.



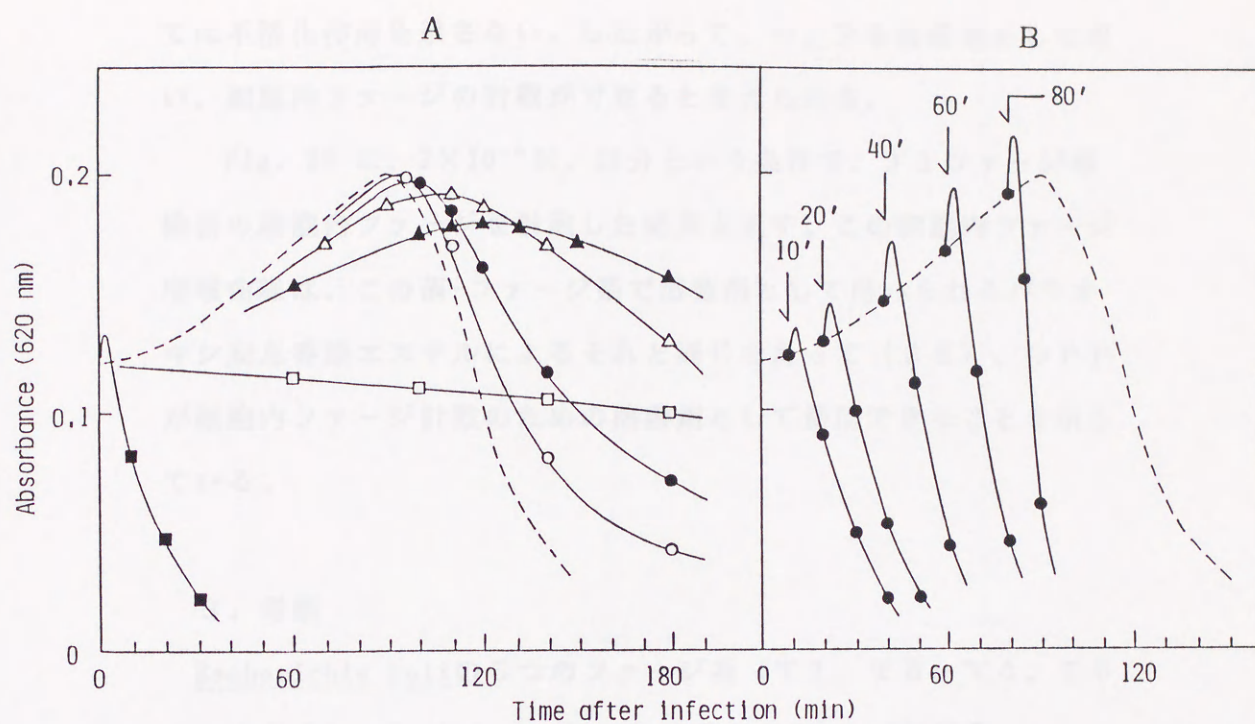


Fig. 34. Effect of *o*-phenylphenol on lysis of phage J1-infected cells.

See the legend to Fig. 31, but MRT broth was used instead of nutrient broth.

A, Different concentrations of OPP were added at the time of infection.

B, OPP ( $2 \times 10^{-3}$  M) was added at the times indicated in the figure.



#### 7. オルトフェニルフェノールを用いる細胞内ファージの計数

OPPは、J 1 ファージ感染菌に対して、ファージ感染後のどの時期に添加しても直ちに溶菌を引き起こすが、遊離ファージに対しては不活化作用を示さない。したがって、OPPを溶菌剤として用い、細胞内ファージの計数ができると考えられる。

Fig. 35 に、 $2 \times 10^{-3}$  M、20分という条件で、J 1 ファージ感染菌の細胞内ファージを計数した結果を示す。この細胞内ファージ増殖曲線は、この菌-ファージ系で溶菌剤として用いられるパラオキシ安息香酸エステルによるそれと同じであって(26)、OPPが細胞内ファージ計数のための溶菌剤として使用できることを示している。

#### 8. 考察

Escherichia coliの5つのファージ系(T 1、T 3、T 4、T 5、 $\phi$  x 174)、Bacillus subtilisの2つのファージ(M 2、S P O 1)系、および Lactobacillus casei のJ 1 ファージ系に対するOPPの作用について研究し、次のことが分かった。

宿主菌に対するOPPの作用は、菌株によって相違するが、 $8 \sim 20 \times 10^{-4}$  Mで殺菌的であった。前章のEscherichia coli K-12の $6 \times 10^{-4}$  Mに比べ、高い濃度である。

OPPの殺菌濃度において、各ファージに対してファージ不活化作用はみられず、また各ファージの吸着に対する阻害もみられなかった。これは、前章のS 1 およびS 2 ファージの場合と同じである。

OPPは、各ファージの増殖を阻害したが、宿主菌の殺菌的濃度



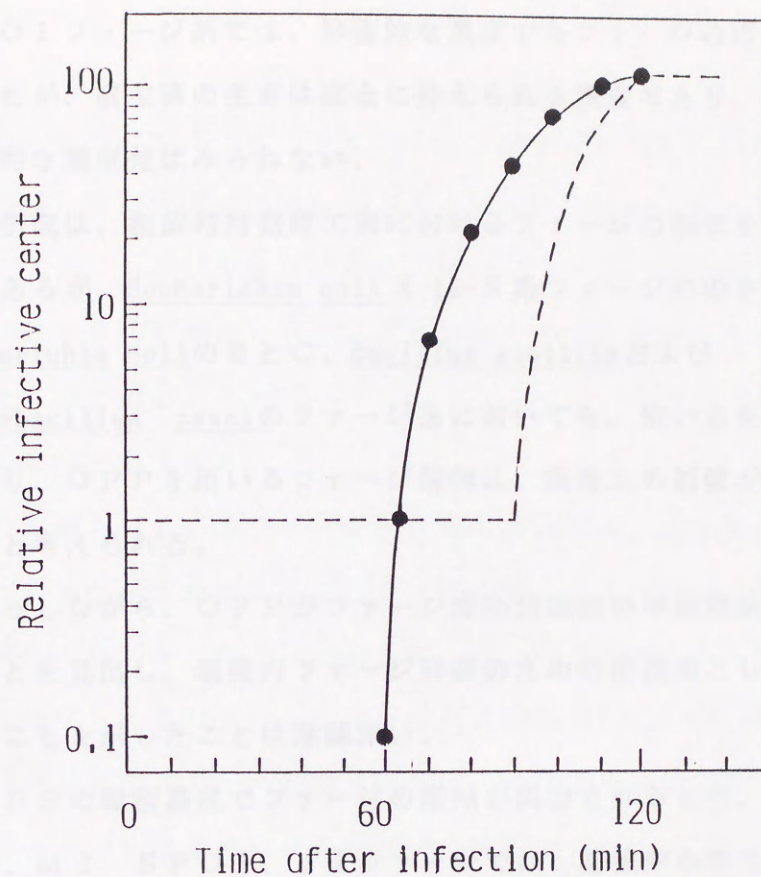


Fig. 35. Determination of intracellular phage J1 by premature lysis with o-phenylphenol.

Aliquots were withdrawn from one-step growth tube and incubated with OPP ( $2 \times 10^{-3}$  M) for 20 min at 37°C.

..., One-step growth curve; ●, Intracellular growth curve.



においてであり、ファージの増殖阻害と宿主菌の生育阻害との間に選択的な濃度差は認められなかった。Bacillus subtilis Y-S P O 1 ファージ系では、静菌的な濃度でもファージの増殖は阻害されたが、宿主菌の生育は完全に抑えられる濃度であり、ここでも選択的な濃度差はみられない。

本研究は、細菌利用発酵工業におけるファージの制御を目指すものであるが、Escherichia coli K-12-S 系ファージの場合と同様、Escherichia coli の B と C、Bacillus subtilis および Lactobacillus casei のファージ系においても、使い方を工夫しない限り、O P P を用いるファージ制御は、実用上の価値がほとんどないと考えられる。

しかしながら、O P P がファージ感染菌細胞の早期溶菌を誘起することを見出し、細胞内ファージ計数のための溶菌剤として利用できることを示したことは意義深い。

O P P の殺菌濃度でファージの増殖が阻害されるとき、T 4、T 5、M 2、S P O 1、J 1 ファージでは、感染中心数の減少がみられた。Escherichia coli の T 4、T 5 ファージでは、比較的ゆるやかな減少であったが、Bacillus subtilis の M 2、S P O 1 および Lactobacillus casei の J 1 ファージでは、急速な減少であった (Fig. 29、30)。M 2、S P O 1 ファージにおけるファージ感染中心数の減少は、早期溶菌によるようにみえたが、実際に培養濁度を測定すると、著しい溶菌はみられず、培養濁度のゆるやかな減少が続くだけである (Fig. 33)。Bacillus subtilis Y の場合、ファージ非感染菌でも O P P のこの濃度では、培養濁度のゆるやかな減少がみられるので (Fig. 25)、ファージ感染菌の培養濁度の減



少は、ファージと無関係なものであると考えられる。したがって、感染中心数の著しい減少は、早期溶菌によるものではなく、感染菌細胞内におけるファージゲノムの喪失ないし複製阻害によるものであろう。

これに対して、T4、T5、J1ファージにおける感染中心数の減少は、早期溶菌によるものである(Fig. 27、30、31、34)。

T4、T5ファージの場合、OPPによるファージ感染菌の早期溶菌は、OPPの添加から溶菌完了まで数十分以上を要する穏和なものである、これに対して、J1ファージの場合、OPPの添加後約10分で溶菌が完了する。

一般に知られているファージ感染菌の溶菌剤は、潜伏期の前半に添加されたときは溶菌を起こさず、潜伏期の後半に添加されたときに溶菌作用を示す(27)。これは、作用機序の面から見て、感染後期に合成されるファージエンドリジンの細胞内蓄積と関係があるためである。つまり、一般の溶菌剤による溶菌作用の本質は、ファージエンドリジンの働きによる酵素的なものである。

OPPによる溶菌は、ファージ非感染菌細胞では起らないが、ひとたびファージ感染すると誘起されるようになる。一般にファージが感染すると菌細胞膜の透過性が増大することが知られている(28~31)。他方、模型システムの実験から、リポ蛋白質の単分子膜を透過した界面活性剤様物質は、表面圧を著しく増大して溶菌を引き起こすことが示されている(32)。OPPは、その分子構造の両親媒性からして、界面活性作用があると考えられる。

Fig.34 B に示すように、OPPを添加すると、溶菌に先立って濁度が一時的に急上昇するが、これは菌細胞の一時的膨張を示して



いる。

以上総合すると、OPPによるJ1ファージ感染菌細胞の溶菌について、次のような仮説をたてることができる。すなわち、ファージの感染によって透過性の増加した細胞膜を通過してOPPが細胞内に入り、細胞の表面圧が著しく増大するために、物理的に溶菌が誘起されることが考えることができる。

OPPによるT4とT5ファージ感染菌の早期溶菌の機序についても、J1ファージの場合と基本的には同様であると考えられる。

OPP以外の食品添加物の保存料については、これまでに、安息香酸(23、24)、サリチル酸(23、24)、ソルビン酸(23、24)、デヒドロ酢酸(23~25)、プロピオン酸(24、25)、パラオキシ安息香酸エステル類(23、24、26)について研究されている。この中で、パラオキシ安息香酸エステルは、OPPと同じ様に、J1ファージ感染 *Lactobacillus casei* の早期溶菌を起こすことが知られている(26)。しかし、パラオキシ安息香酸エステルの場合、添加から溶菌完了まで20分を要しているの、OPPの方が溶菌完了までの時間が短く、よりすぐれた溶菌剤である。

## 9. 小括

OPPの *Escherichia coli* の5つのファージ系(T1、T3、T4、T5、 $\phi$ x174)、*Bacillus subtilis* の2つのファージ系(M2、SPO1)および *Lactobacillus casei* のJ1ファージ系に対する作用について研究し、次のことが分かった。

(1) 宿主菌に対して $8\sim 20 \times 10^{-4}$  Mで殺菌的である。(2) 殺菌的濃



度においてファージを不活化しない。(3) また、ファージの吸着を阻害しない。(4) ファージの増殖を阻害する。このとき T 4、T 5、M 2、S P O 1、J 1 ファージでは、感染中心数が減少する。(5) T 4、T 5、J 1 ファージでは、ファージ感染菌の早期溶菌を誘起する。(6) J 1 ファージの場合は、特に著しく、溶菌剤として用いて J 1 ファージ感染菌の細胞内ファージを計数することができる。



## 第 10 章 温度と食塩による ファージの制御

## 1. 緒言

前述のように、ファージの防御を目指して、多数の研究が行われてきたが（１、２）、ファージの防御に関する一般的な方法は、いまだに確立されていない。したがって、新しい観点からのファージ防御法の確立が待たれている。

好塩菌のファージに関する研究はあるが(33、34)、ファージの制御を目指して、食塩のファージおよびファージ増殖に対する作用については研究されていない。そこで、S1およびS2ファージを用いて、ファージ増殖に対する食塩の作用について追究し、食塩の適切な使用によるファージ制御の可能性について検討した。

更に、新しい考えとして、痛の温熱化学療法等にヒントを得たものであるが、食塩の共存下で比較的穏和な熱処理（細菌の加熱致死におけるアレニウスプロットを描いたときの屈曲点である約43℃を中心とした温度）を行ったときのファージの増殖阻害について検討した。

## 2. 宿主菌に対する温度の影響

S 1 および S 2 ファージの宿主菌である *Escherichia coli* K-12  
に対する温度の影響について                      ここでは、  
37℃より高い温度の影響について詳細に検討した。

Fig. 36 に、*Escherichia coli* K-12に対する高温の影響を示す。



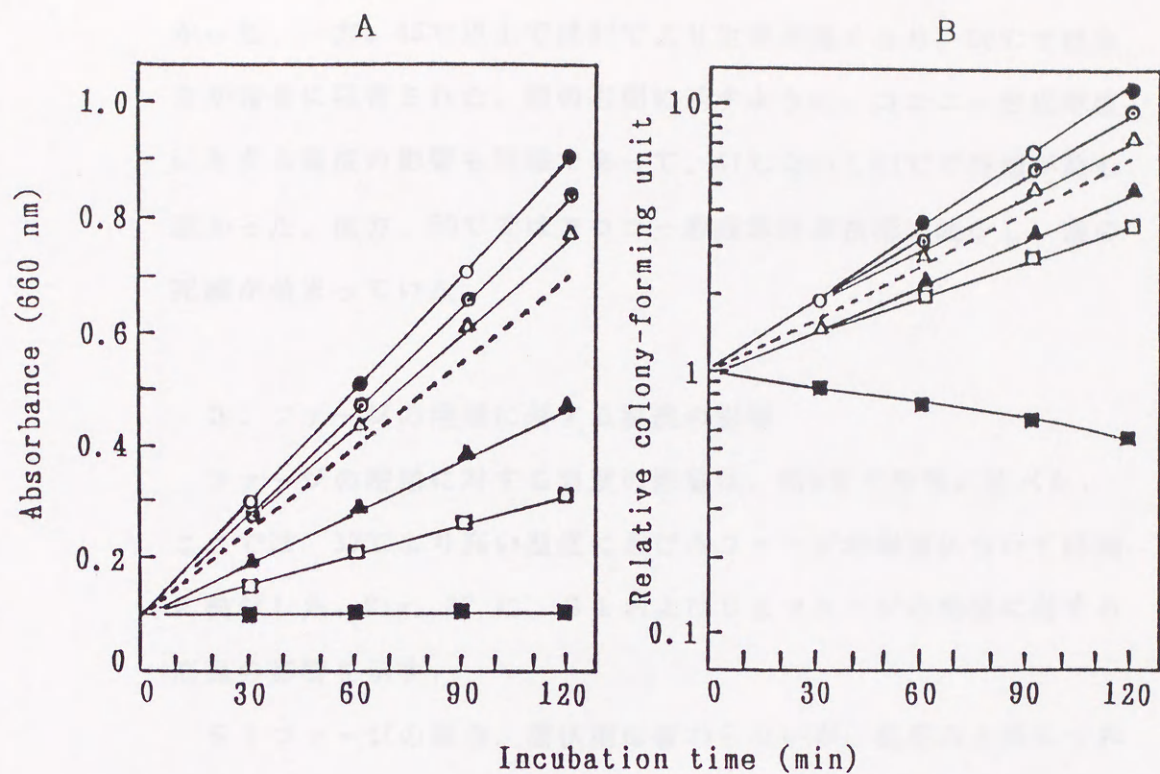


Fig. 36. Effects of high temperature on cellular growth and colony-forming ability of *Escherichia coli* K-12.

Bacteria ( $2 \times 10^9$  cells/ml) were incubated in nutrient broth at different temperatures. Temperature :  $\cdots$ , 37°C;  $\odot$ , 39°C;  $\circ$ , 41°C;  $\bullet$ , 42°C;  $\triangle$ , 43°C;  $\blacktriangle$ , 45°C;  $\square$ , 47°C;  $\blacksquare$ , 50°C.

A : Cellular growth;

B : Colony-forming ability. The initial number of cells is represented as 1.



図の左側に示すように、培養濁度(生育)からみて、41℃ないし42℃が生育の最適温度であった。39℃と43℃でも、37℃より生育が速かった。一方、45℃以上では37℃より生育が遅くなり、50℃では生育が完全に阻害された。図の右側に示すように、コロニー形成単位に対する温度の影響も同様であって、41℃ないし42℃で増殖が最も速かった。他方、50℃ではコロニー形成単位が次第に減少し、菌の死滅が始まっていた。

### 3. ファージの増殖に対する温度の影響

ファージの増殖に対する温度の影響は、第5章で簡単に述べた。ここでは、37℃より高い温度におけるファージの増殖について詳細に検討した。Fig. 37 に、S 1 および S 2 ファージの増殖に対する高温の影響を示す。

S 1 ファージの場合、潜伏期は変わらないが、温度の上昇につれてバーストサイズが次第に減少し、43℃では、37℃の約450に比べ2と著しく減少した。菌の生育最適温度に近い43℃でファージの増殖がほぼ完全に阻害されることから、S 1 ファージは、温度感受性のファージであると考えられる。なお、45℃ではファージの増殖が完全に阻害された。

S 2 ファージの場合、43℃でのバーストサイズは、37℃での約100に比べ約40であって、ファージの増殖が完全に阻害される温度は、50℃であった。

以上のように、S 1 および S 2 ファージの増殖を完全に抑える温度は、それぞれ、45℃および50℃であった。そこで、この温度においてファージ増殖のどの段階が阻害されるのかを知るために、温度



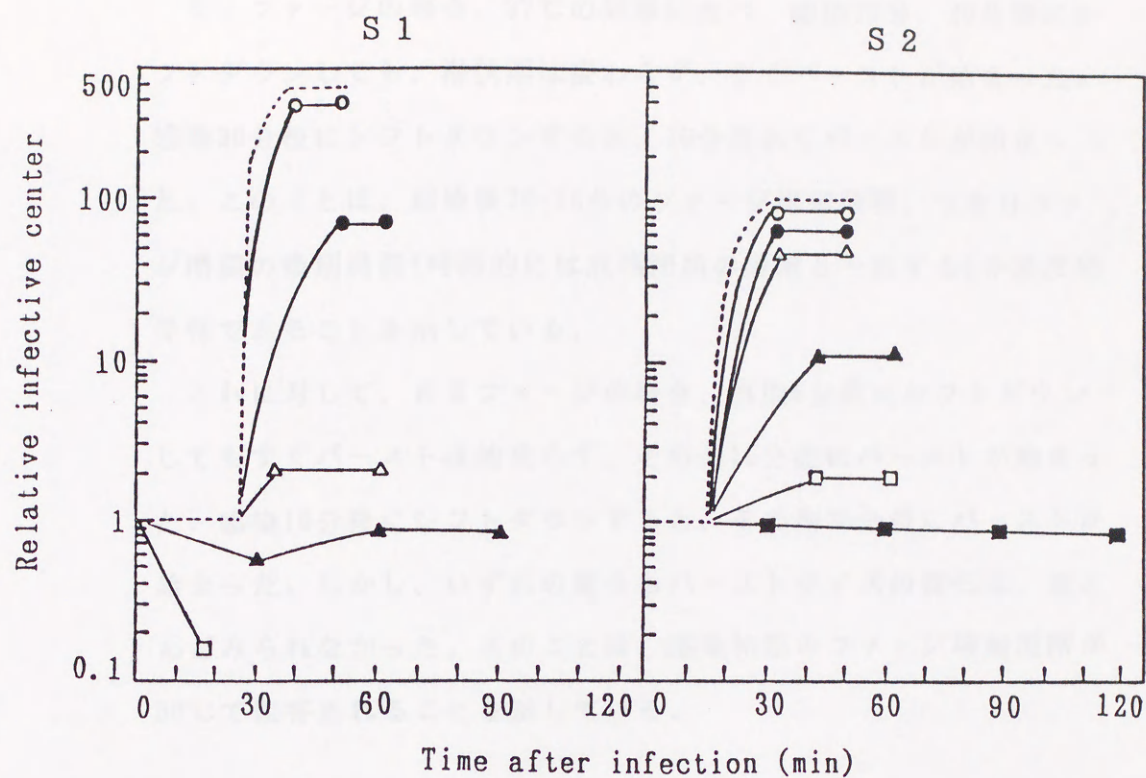


Fig. 37. Effects of high temperature on one-step growth of S-phages.

See the legend to Fig. 11. Temperature : ..., 37°C; O, 40°C;

●, 42°C; Δ, 43°C; ▲, 45°C; □, 48°C; ■, 50°C.



シフトダウン実験を行った。Fig. 38 にその結果を示す。

S 1 ファージの場合、37℃の対照に比べ、感染10分、20分後にシフトダウンしても、潜伏期は変わらず、すぐバーストが始まった。感染30分後にシフトダウンすると、10分遅れてバーストが始まった。このことは、感染後20~28分のファージ増殖段階、つまりファージ増殖の後期過程(時間的には成熟開始の段階と一致する)が温度感受性であることを示している。

これに対して、S 2 ファージの場合、感染5分後にシフトダウンしてもすぐバーストは始まらず、その約15分後にバーストが始まった。感染10分後にシフトダウンすると、その約25分後にバーストが始まった。しかし、いずれの場合もバーストサイズの変化は、ほとんどみられなかった。このことは、感染初期のファージ増殖段階が50℃で阻害されることを示している。

#### 4. 宿主菌に対する食塩の作用

*Escherichia coli*は、非好塩菌・非耐塩菌であって、生育に最適の食塩濃度は0.2M以下である。S 1 およびS 2 ファージの宿主菌である *Escherichia coli* K-12に対する食塩(塩化ナトリウム)の作用について検討した。

Fig. 39 に、37℃における食塩の作用を示す。図の左側に示すように、食塩を添加すると、濃度に応じて培養濁度が一時的に急上昇した。培養濁度(生育)に及ぼす食塩の作用は、0.2M付近から見られ始め、0.8Mでは生育が完全に阻害された。しかし、この生育阻害濃度およびより高濃度において、培養濁度の減少(溶菌)は、見られなかった。



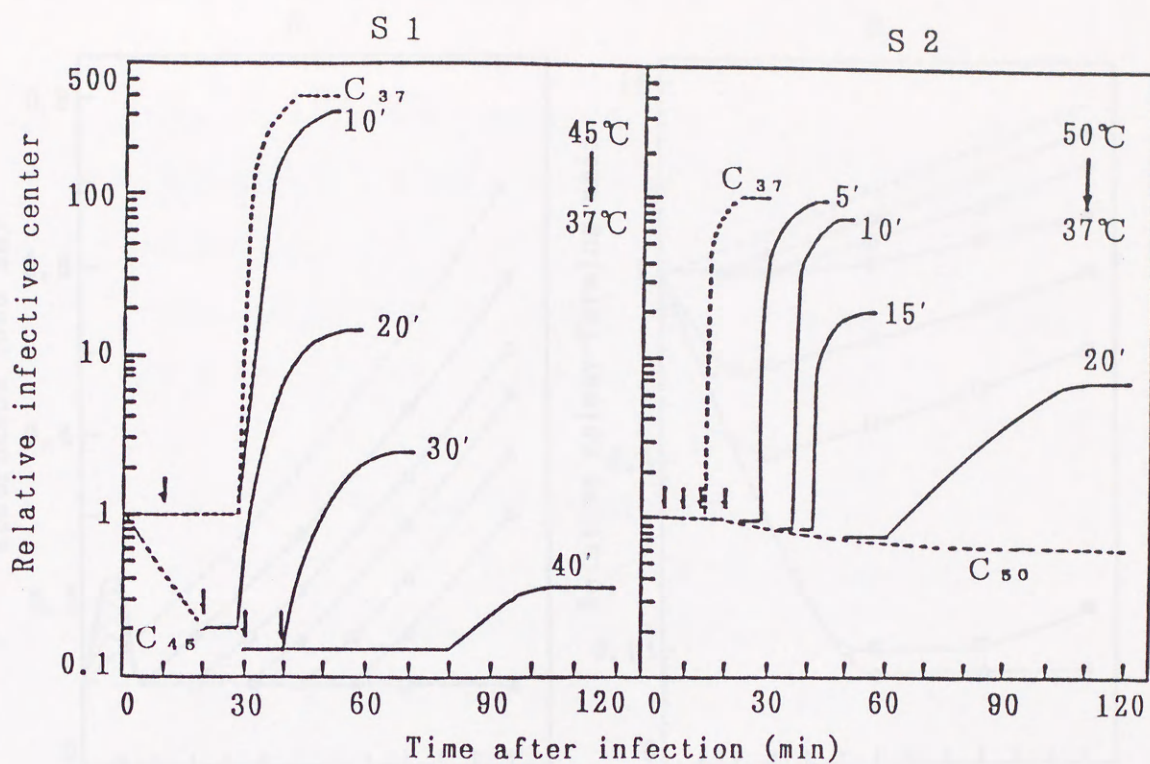


Fig. 38. Phage growth following temperature shift-down.

See the legend to Fig. 11, but the temperatures were shifted-down to 37°C at the times indicated in the figure.

C<sub>37</sub>, control at 37°C through; C<sub>45</sub> and C<sub>50</sub>, control at 45°C and 50°C, respectively.



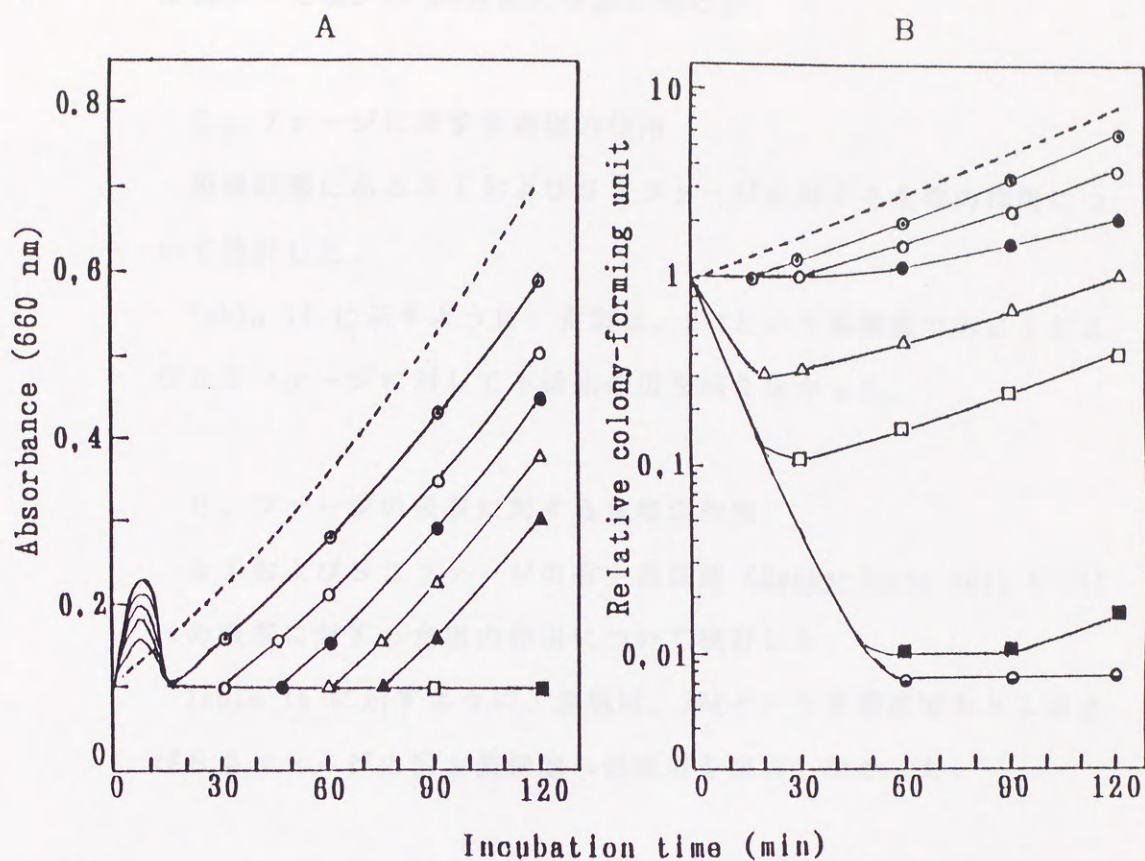


Fig. 39. Effects of sodium chloride on cellular growth and colony-forming ability of *Escherichia coli* K-12.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were incubated in nutrient broth with NaCl at  $37^\circ\text{C}$ . The initial number of cells is represented as 1. Concentrations of NaCl (M) :  $\cdots$ , 0;  $\odot$ , 0.2;  $\circ$ , 0.3;  $\bullet$ , 0.4;  $\triangle$ , 0.6;  $\blacktriangle$ , 0.7;  $\square$ , 0.8;  $\blacksquare$ , 1.0.  $\ominus$ , 1.2.

A : Cellular growth; B : Colony-forming ability.



図の右側に示すように、0.6~1.0Mでは、コロニー形成単位が一度減少した後、20~90分後に増加し始めた。

#### 5. ファージに対する食塩の作用

遊離状態にあるS 1およびS 2ファージに対する食塩の作用について検討した。

Table 14 に示すように、食塩は、2Mという高濃度でもS 1およびS 2ファージに対して不活化作用を示さなかった。

#### 6. ファージの吸着に対する食塩の作用

S 1およびS 2ファージの宿主菌細胞 (*Escherichia coli* K-12) への吸着に対する食塩の作用について検討した。

Table 15 に示すように、食塩は、2Mという高濃度でもS 1およびS 2ファージの宿主菌細胞への吸着を阻害しなかった。

#### 7. ファージの増殖に対する食塩の作用

S 1およびS 2ファージの増殖に対する食塩の作用について検討した。 Fig. 40 にその結果を示す。

S 1ファージの場合、食塩の濃度が高くなるにつれて潜伏期が次第に延長し、バーストサイズが次第に減少した。 0.5、0.6Mでは、感染中心数が一度減少した後、上昇した。 0.7Mおよびそれ以上の濃度では、ファージの増殖は完全に阻害された。このとき、感染中心数は減少するだけで上昇は見られなかった。

S 2ファージの場合、S 1ファージと同じような傾向であったが、違うところは、0.6Mでもかなりバーストすることと、高濃度



Table 14. Effects of sodium chloride on free S-phages

Concn. (M)	Survival (%)	
	S1	S2
0	100	100
1	90~100	90~100
2	90~100	90~100

Phages ( $4 \times 10^7$  PFU/ml) were incubated in nutrient broth (pH 7) with NaCl at 37°C for 120 min.



Table 15. Effects of sodium chloride on adsorption of S-phages

Concn. (M)	Phage adsorbed (%)	
	S1	S2
0	95	30
1	95	30
2	95	30

Bacteria ( $2 \times 10^8$  cells/ml) were mixed with phage ( $2 \times 10^8$  PFU/ml) and allowed to adsorb phages for 5 min at 37°C. NaCl was added just prior to adsorption. The unadsorbed phages were assayed by a 100-fold dilution of the adsorption mixture, following the sedimentation of adsorbed phages by centrifugation. Input of phages is represented as 100%.



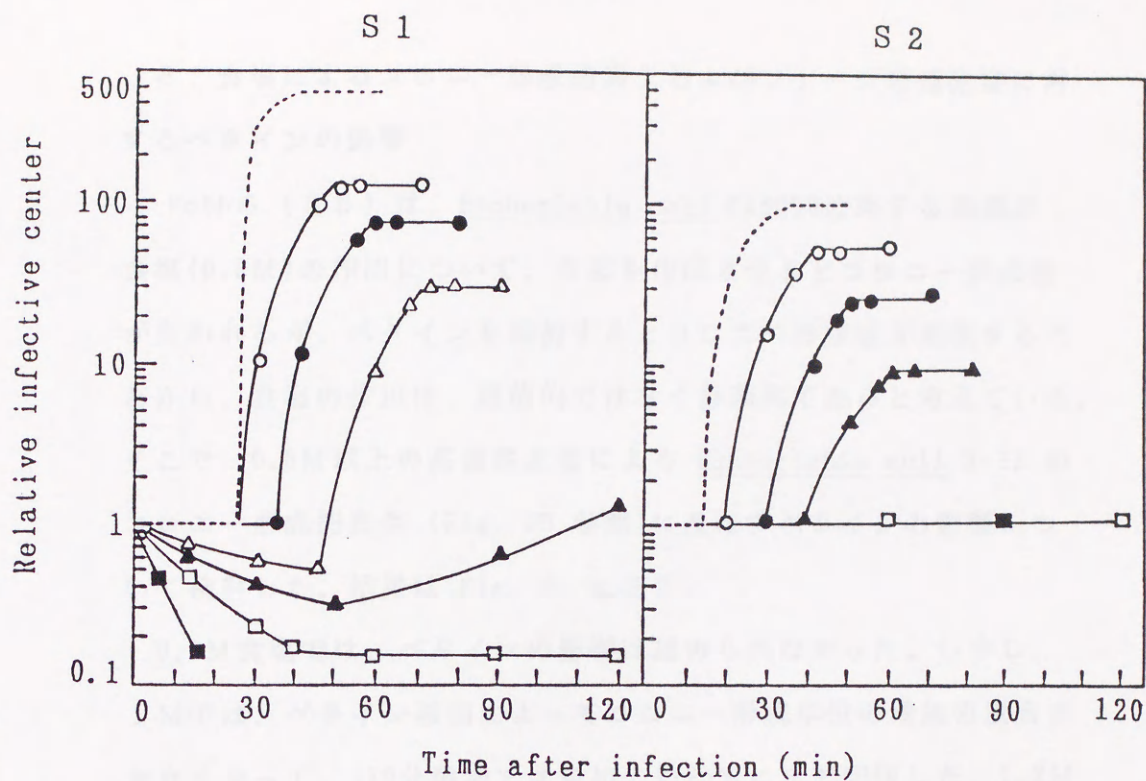


Fig. 40. Effects of sodium chloride on one-step growth of S-phages.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were infected with phage (m.o.i., ca. 0.1). After 3 min of adsorption and 2 min of antiserum treatment, the infected cells were diluted 1:2000 into nutrient broth with NaCl and incubated at  $37^\circ\text{C}$ . The number of initial infected cells is represented as 1. Concentrations of NaCl (M) :  
 ---, 0; ○, 0.2; ●, 0.4; △, 0.5; ▲, 0.6; □, 0.7; ■, 1.0.



でも感染中心数の減少が見られないことであった。

#### 8. 食塩によるコロニー形成能喪失およびファージ増殖阻害に対するベタインの影響

Rothら (35) は、Escherichia coli CA8000に対する高濃度食塩(0.8M)の作用について、食塩を作用させるとコロニー形成能が失われるが、ベタインを添加するとコロニー形成能が回復することから、食塩の作用は、殺菌的ではなく静菌的であると考えている。そこで、0.8M以上の高濃度食塩による Escherichia coli K-12 のコロニー形成能喪失 (Fig. 39 参照)に及ぼすベタインの影響について検討した。結果は Fig. 41 に示す。

0.8M食塩では、ベタインの影響は認められなかった。しかし、1Mでは、ベタイン添加によってコロニー形成単位の増加の度合いが大きくなって、120分添加では最初の約20%にまで回復した。1.2Mでは、コロニー形成単位の増加は見られないのに、ベタイン添加によってコロニー形成単位が増加し、120分添加では最初の約6%にまで回復した。

したがって、S1およびS2ファージの宿主菌であるEscherichia coli K-12の場合も、Escherichia coli CA8000の場合と同様、高濃度食塩によるコロニー形成単位の減少は、殺菌的なものでなく静菌的なものであると考えられる。

次に、食塩によるファージ増殖阻害 (Fig. 39 参照)に対するベタインの影響について検討した。結果は Fig. 42 に示す。

1Mの食塩を作用させるとファージ増殖は完全に阻害される。そして、感染中心数が減少し、60分から一定になる。このとき、感染



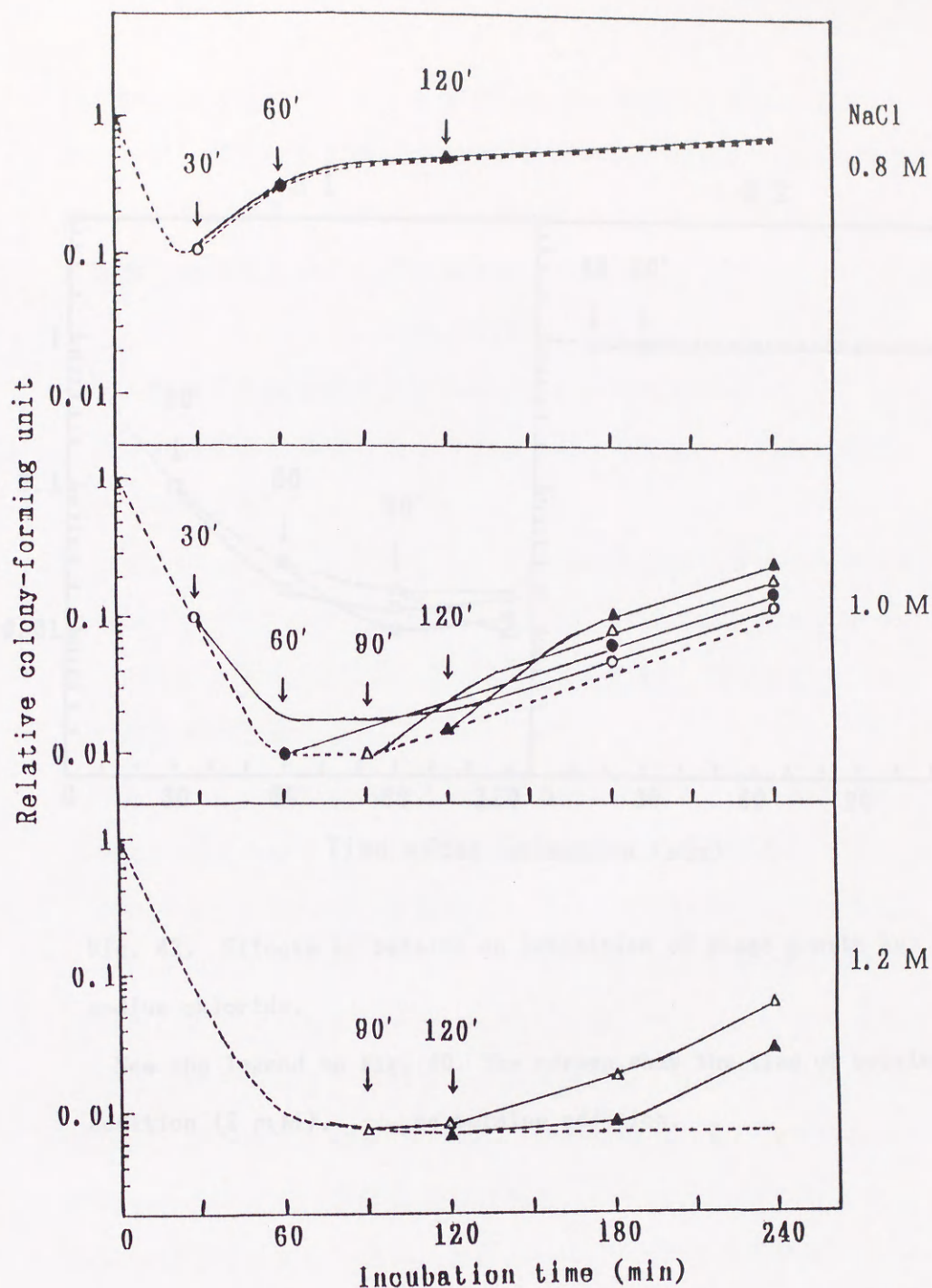


Fig. 41. Loss of colony-forming ability and restoration by betaine in sodium chloride -upshocked culture of *Escherichia coli* K-12.

Bacteria ( $2 \times 10^9$  cells/ml) were incubated in nutrient broth at  $37^\circ\text{C}$  and NaCl was added at time zero. The initial number of cells is represented as 1. The arrows show the time of betaine addition (2 mM). ---, no betaine addition.



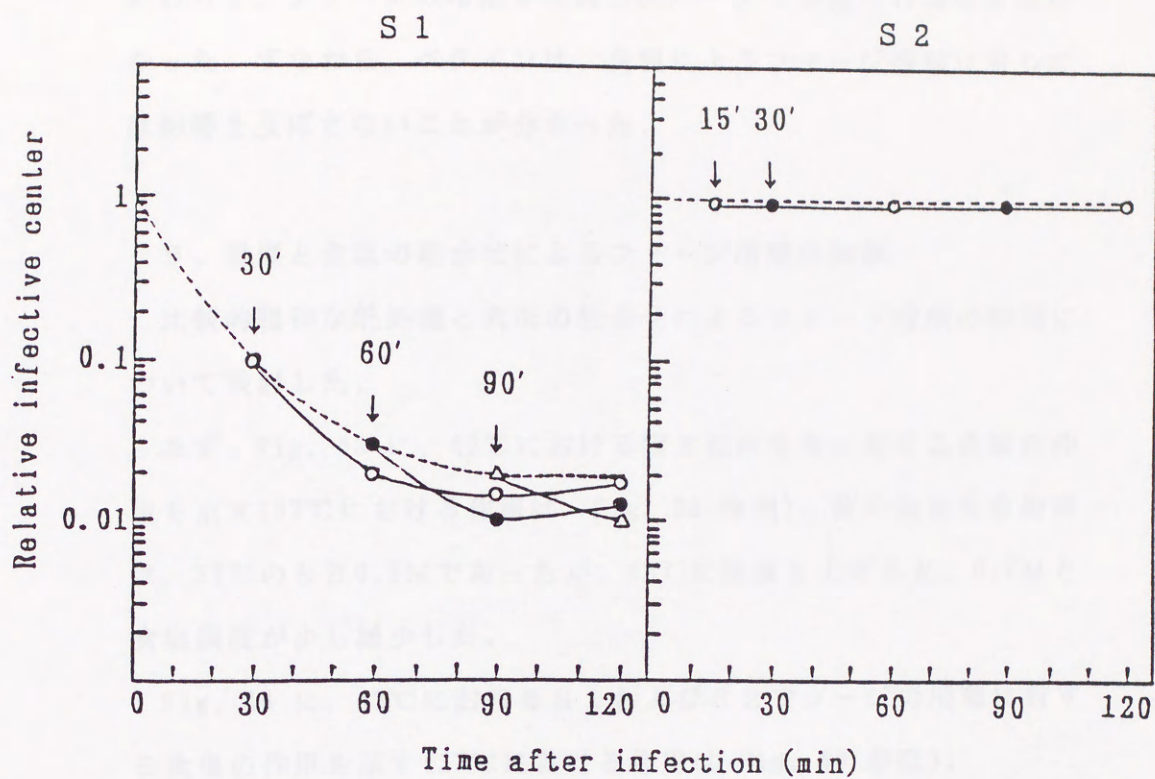


Fig. 42. Effects of betaine on inhibition of phage growth by sodium chloride.

See the legend to Fig. 40. The arrows show the time of betaine addition (2 mM). ---, no betaine addition.



30、60、90分後にベタインを添加したが、無添加の対照とほとんど変わらず、ファージの増殖が再開されバーストが見られることはなかった。すなわち、ベタインは、食塩によるファージ増殖に対しては影響を及ぼさないことが分かった。

#### 9. 温度と食塩の組合せによるファージ増殖の抑制

比較的穏和な熱処理と食塩の組合せによるファージ増殖の抑制について検討した。

まず、Fig. 43 に、42℃における宿主菌の生育に対する食塩の作用を示す(37℃における作用は Fig. 39 参照)。菌の完全生育抑制は、37℃のとき0.8Mであったが、42℃に温度を上げると、0.7Mと食塩濃度が少し減少した。

Fig. 44 に、42℃におけるS 1およびS 2ファージの増殖に対する食塩の作用を示す(37℃における作用は Fig. 40 参照)。

S 1ファージの場合、食塩の0.2、0.4Mで潜伏期は37℃のそれと変わらなかったが、バーストサイズは大幅に減少した。0.5Mでは、感染中心数が一度減少した後、上昇したが、バーストサイズは1以上にならず、全体としてファージの増殖は抑えられた。0.6Mでは、感染中心数が次第に減少し、ファージの増殖は完全に抑えられた。すなわち、ファージ増殖の完全抑制は、37℃のときは0.7Mであったが、42℃に温度を上げることによって、0.6Mと食塩濃度が少し減少した。

S 2ファージの場合、0.2~0.6Mで潜伏期は、37℃のそれと変わらなかったが、バーストサイズは次第に減少した。ファージの増殖は、0.5、0.6Mでほぼ完全に抑えられ、0.7Mでは完全に抑えられ



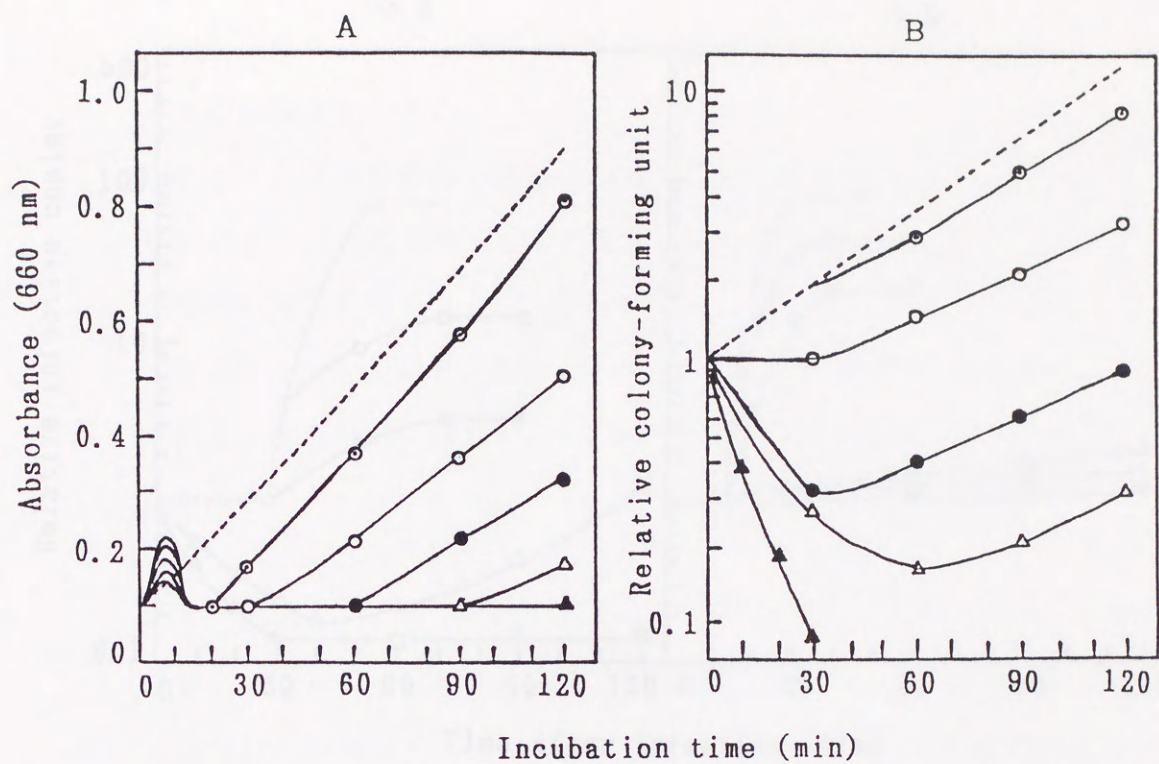


Fig. 43. Cellular growth and colony-forming ability of *Escherichia coli* K-12 at 42°C.

See the legend to Fig. 39, but incubated at 42°C instead of 37°C.



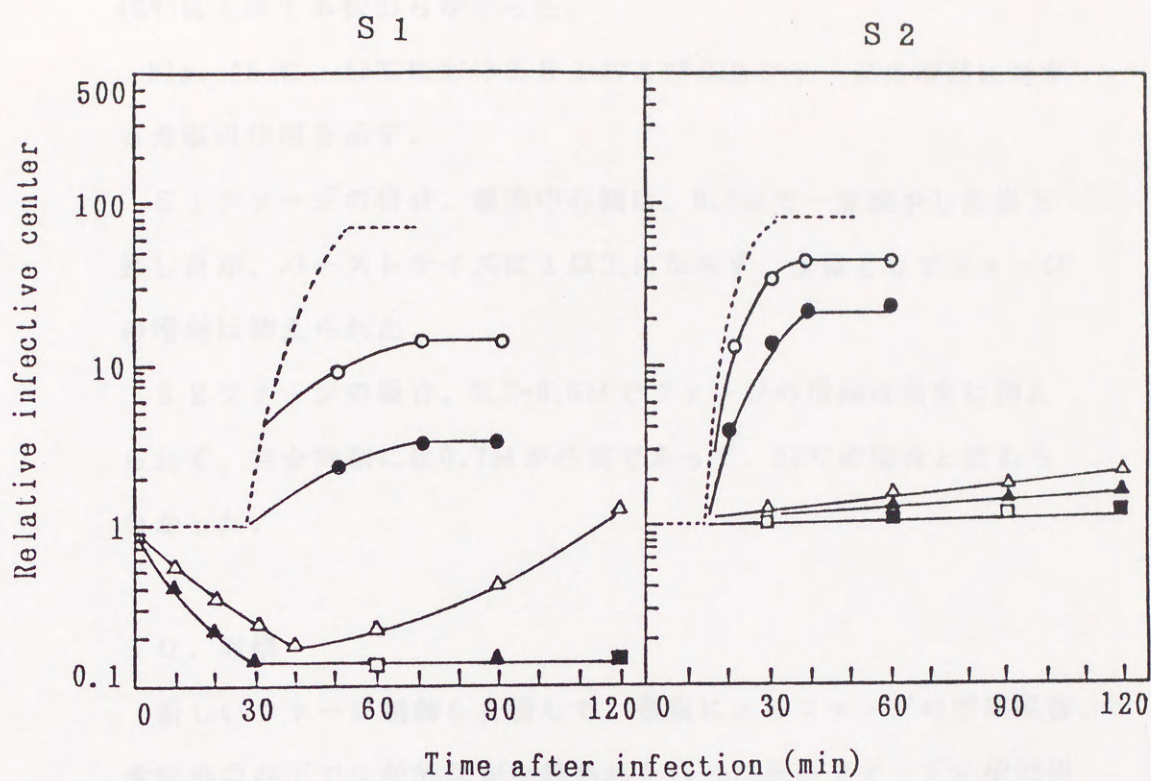


Fig. 44. Effects of sodium chloride on one-step growth of S-phages at 42°C.

See the legend to Fig. 40.



た。この場合、ファージ増殖を完全に抑制する食塩濃度は、温度を42℃に上げてても変わらなかった。

Fig. 45 に、43℃におけるS 1 およびS 2 ファージの増殖に対する食塩の作用を示す。

S 1 ファージの場合、感染中心数は、0.2Mで一度減少した後上昇したが、バーストサイズは1以上にならず、全体としてファージの増殖は抑えられた。

S 2 ファージの場合、0.2~0.6Mでファージの増殖は完全に抑えられず、完全抑制には0.7Mが必要であって、37℃の場合と変わらなかった。

#### 10. 考察

新しいファージ制御を目指して、食塩によるファージの増殖阻害、食塩の共存下で比較的穏和な熱処理を行ったきのファージの増殖阻害について追究するために、高温の影響、食塩の作用、高温と食塩の組み合わせによるファージ制御に分けて検討した。

まず、37℃より高い温度の宿主菌に対する影響について検討した。その結果、41℃ないし42℃で菌の生育速度が最も速いことが分かった。更に高温では生育速度が低下し始めたが、43℃では37℃のそれより速かった。45℃以上では37℃より生育が遅くなり、50℃では生育が完全に抑えられた。

ファージの増殖に対する高温の影響は、ファージによって相違した。S 1 ファージの場合、43℃のバーストサイズは、37℃のときの約0.4%であって、ファージの増殖はほぼ完全に阻害された。すなわち、37℃より菌の生育が速い43℃でファージの増殖はほぼ完全に



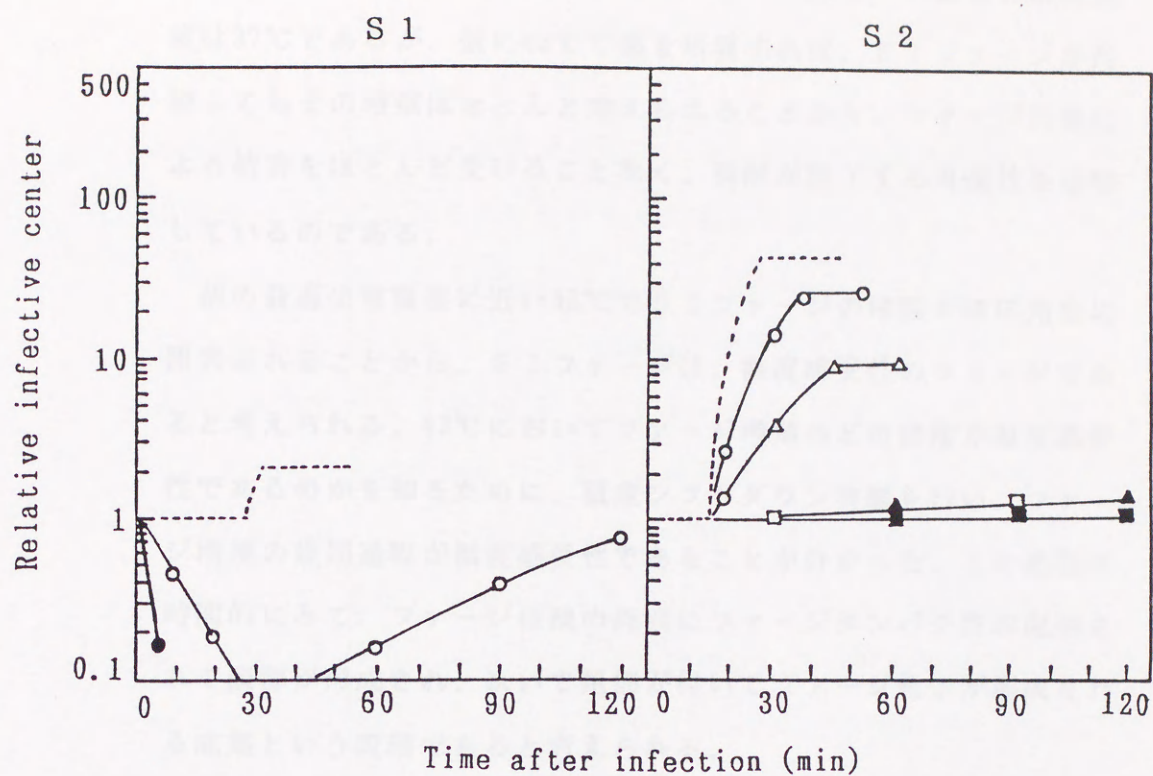


Fig. 45. Effects of sodium chloride on one-step growth of S-phages at 43°C.

See the legend to Fig. 40. Concentrations of NaCl (M) :

..., 0; ○, 0.2; ●, 0.3; △, 0.4; ▲, 0.5; □, 0.6; ■, 0.7.



抑えらえるということで、この発見の意味は大きい。通常の培養温度は37℃であるが、仮に43℃で菌を培養すれば、S 1 ファージが汚染してもその増殖はほとんど抑えらえることから、ファージ汚染による被害をほとんど受けることなく、発酵が終了する可能性を示唆しているのである。

菌の最適生育温度に近い43℃でS 1 ファージの増殖がほぼ完全に阻害されることから、S 1 ファージは、温度感受性のファージであると考えられる。43℃においてファージ増殖のどの段階が温度感受性であるのかを知るために、温度シフトダウン実験を行い、ファージ増殖の後期過程が温度感受性であることが分かった。この過程は、時間的にみて、ファージ核酸の周囲にファージタンパク質が配列されて頭部が形成され、次いで尾部が付いてファージ粒子が形成される成熟という段階であると考えられる。

なお、S 2 ファージは、温度感受性ではなく、50℃においてファージの増殖が完全に阻害されたが、この温度におけるファージ増殖の阻害は、ファージ増殖の初期の段階であることが分かった。

次いで、食塩の宿主菌およびS 1、S 2 ファージの増殖に対する作用について検討した。

食塩の宿主菌に対する作用については、特徴的なこととして、食塩を添加すると培養濁度が一時的に急上昇することがあった(Fig. 39参照)。この間、総菌数に変動は見られなかったので、この培養濁度の上昇は、浸透圧の急変による菌細胞の一時的膨大によると考えられる。0.6~1.0Mでは、コロニー形成単位が一度減少した後、20~90分後に増加し始めた(Fig. 39, Fig. 41参照)。これは食塩に対する生理的適応によって菌の生育が遅れて始まるためと考えられ



る。

食塩によるコロニー形成能喪失に対するベタインの影響については、1.2M食塩によって失われたコロニー形成能がベタインによって回復することから、高濃度食塩によるコロニー形成能の喪失は、殺菌的なものではなく静菌的なものであると考えられる。

Rothら(35)の *Escherichia coli* CA8000と比べると、*Escherichia coli* K-12は、生理的適応が早くて大きいといえる。また、耐塩性がより強いということもいえる。したがって、0.8Mではベタインの効果が表われず、1M以上で表われたと考えられる。

37℃のとき、*Escherichia coli* K-12の生育が0.8M食塩で阻害された。他方、食塩によってS1およびS2ファージの増殖も阻害された。しかし、ファージ増殖の完全阻害は、宿主菌の生育が完全に抑えられる0.7M以上においてであり、ファージ増殖阻害と宿主菌生育阻害との間に選択的な濃度差は認められなかった。したがって、37℃においては使い方について工夫しない限り、食塩を用いるファージの制御は、実用上の価値がほとんどないと考えられる。

そこで、高温と食塩の組合せによるファージ増殖の抑制について検討した。

宿主菌の生育は、37℃のとき食塩の0.8Mで完全に抑制されたが、42℃に温度を上げると食塩の濃度が0.7Mと少し減少した。

ファージ増殖に対する食塩の作用は、S1ファージの場合、ファージ増殖の完全抑制は、37℃のとき0.7Mであったが、42℃に温度を上げることによって0.6Mと食塩濃度が少し減少した。更に、43℃に上げると、0.2Mと食塩濃度が著しく減少した。

他方、S2ファージの場合、温度を上げても食塩濃度が減少する



ことはなかった。

この結果、ファージによっては、温度を上げることによってより薄い濃度の食塩でファージの増殖を抑えることができることが分かった。すなわち、温度を上げることによって、ファージの増殖阻害と宿主菌生育阻害との間の選択的な濃度差を大きくすることができると示された。食塩の共存下で比較的穏和な熱処理方法を行うこの方法は、更に使い方を工夫することによって、実用化できる可能性があると期待される。

#### 1 1 . 小括

37℃より高い温度の、宿主菌およびS 1、S 2 ファージ増殖に対する影響について、次のことが分かった。(1) 菌の生育は、41℃ないし42℃で最も速い。(2) 43℃でも37℃より速い。(3) 50℃では完全に阻害される。(4) S 1 ファージの増殖は、43℃でほぼ完全に阻害され、45℃で完全に阻害される。(5) S 2 ファージの増殖は、50℃で完全に阻害される。(6) S 1 ファージの場合、43℃で培養することによってファージを制御できる可能性がある。

食塩の宿主菌およびS 1、S 2 ファージ増殖に対する作用について、次のことが分かった。(1) 菌の生育は、0.8Mで完全に抑えられる。(2) ファージの増殖は0.7Mで完全に阻害される。

更に、食塩によるコロニー形成能喪失およびファージ増殖阻害に対するベタインの影響について検討し、次のことが分かった。(1) 高濃度食塩では、ベタインによってとコロニー形成能が回復する。(2) 高濃度食塩によるコロニー形成単位の減少は、殺菌的なものではなく静菌的なものであると考えられる。(3) ファージ増殖阻害に



対しては、影響しない。

温度と食塩の組合せによるファージ増殖の抑制について検討し、次のことが分かった。(1) S 1 ファージの場合、37℃から42℃に上げると、より薄い濃度の食塩でファージ増殖が阻害される。(2) S 2 ファージの場合、42℃に上げててもファージ増殖阻害の食塩濃度は、変わらない。(3) 43℃に上げると、S 1 ファージの増殖は、更に薄い濃度の食塩で阻害される。(4) S 2 ファージの場合は、ファージ増殖阻害の食塩濃度は変わらない。



## 終章

### 1. 終論

セルフクローニングにより、L-セリンの生産能を増強したEscherichia coli K-12を使用しているM社O工場において、この菌株の培養中に2回溶菌現象が起こった。著者は、この溶菌液から、それぞれファージを分離した。従って、溶菌現象がファージ汚染によることを明らかにしたことになる。従来、発酵とファージに関する研究は数多いが、菌は、自然界から分離された株および変異技術によって育成された変異株であって、遺伝子工学技法により造成された菌を侵すファージの分離は、これが最初である。

次いで、S 1 および S 2 と命名したこれらのファージの諸性状について研究したが、この目的の一つは、S 1 ファージと S 2 ファージの相違を明らかにすることであつた。すべての結果は、S 1 ファージと S 2 ファージが明らかに違うファージであることを示している。このことは、サザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて検討したファージゲノムの相同性に関する研究からも明らかであつて、S 1 および S 2 ファージが遺伝的に異なるファージであることが分かつた。

S 1 および S 2 ファージは、Escherichia coli に対して高い種特異性を示すファージであるが、Escherichia coli には多くのファージが知られている。S 系ファージと Escherichia coli の既知のファージとの相違について検討したが、S 系ファージは、血清学的にも、形態学的にも違う、新しい Escherichia coli のファージであつた。この根拠については、それぞれの章で示した通りである。



更に、これまで知見のなかったオルトフェニルフェノールのファージに対する作用について研究し、ファージ感染菌の早期溶菌を誘起するという新しい知見を得た。

また、これまで知見のなかった食塩のファージに対する作用について研究し、温度と食塩の組合せによるファージ制御の新しい方法を提示した。

最後に、本研究で得られた知見がその他の発酵に対しても参考になり、そのファージの防除対策にも示唆を与えるところがあれば、望外の幸とするものである。

## 2. 総括

1) セルフクローニングにより、セリンの生産能を増強した *Escherichia coli* K-12 を使用している M 社 O 工場において、この菌株の培養中に 2 回溶菌現象が起こった。それぞれの溶菌液から溶菌現象の原因としてファージを分離し、S 1 および S 2 と命名した。このファージの分離を契機として、アミノ酸生産を初め諸有用物質生産において多大な被害を与え、それらの発酵を不安定にする原因となっているファージの防御を目的として、その一つのモデルとして、この遺伝子組換え技法により造成された *Escherichia coli* K-12 の S 系ファージを取り上げ、研究した。

2) S 1 および S 2 ファージの一般的な性状について検討した。すなわち、プラークの形態、感染菌の溶菌、宿主域、温度安定性および pH 安定性について検討した。その結果、S 1 および S 2 ファージは、それぞれ違った性状であることが分かった。



3) S系ファージに対する抗ファージ血清を調製し、そのK価を測定したところ、S 1 ファージで220、S 2 ファージで55であった。

S 1 およびS 2 ファージと抗S 1 およびS 2 ファージ血清の間で交叉中和反応を行ったところ、S 1 ファージとS 2 ファージの間で中和反応は起こらず、この2種類のファージは、血清学的に関係がないことが分かった。

また、抗S 1 およびS 2 ファージ血清とEscherichia coliの代表的な14種類のファージの間で中和反応を行ったが、中和反応は認められなかった。すなわち、S 1 およびS 2 ファージは、Escherichia coliの既報のファージとは違う、新しいファージであることが分かった。

4) ファージの形態と大きさについて検討した。S 1 ファージは、直径75~80 nmの多面体の頭部に長さ150~155 nmの尾部を有していた。尾部は、尾芯に収縮性の鞘筒がかぶさった構造であった。Bradleyの分類のAグループに属することが分かった。

S 2 ファージは、直径55~60 nmの多面体の頭部に長さ155~160 nmの長細い尾部を有しており、Bradley分類のBグループに属することが分かった。

5) ファージの吸着および増殖について検討した。

S 1 ファージの吸着は速く、3分間で90%の吸着率であった。これに対して、S 2 ファージの吸着は遅く、10分間でも35%の吸着率であった。吸着に及ぼす温度の影響について検討し、37℃で吸着率が最も高いことが分かった。更に、I価およびIIの金属イオンやあ



種のアミノ酸が吸着に影響を及ぼすことが分かった。

S 1 ファージは、暗黒期約15分、潜伏期約28分、バーストサイズ約450であった。S 2 ファージは、暗黒期約7分、潜伏期約15分、バーストサイズ約100であった。ファージの増殖に及ぼす温度および pH の影響について検討し、S 1、S 2 両ファージとも、37℃および pH 7.0において増殖が最適であることが分かった。

S 1 ファージでは、45℃以上、pH 4.0以下及び pH 10以上でファージの増殖が見られなかった。S 2 ファージでは、50℃以上、pH 4以下及び pH 10以上でファージの増殖が見られなかった。

#### 6) ファージの核酸について検討した。

S 1 および S 2 ファージの核酸は、2本鎖DNAであった。その塩基成分が通常のグアニン、アデニン、シトシンおよびチミン4つの塩基からなっていた。S 1 DNAの $T_m$ は82℃であって、S 2 DNAのそれは85℃であった。DNAのグアニン-シトシン含量は、S 1 DNAで約31%、S 2 DNAでは約38%であった。DNAの大きさは、S 1 DNAで約52 kbp、S 2 DNAでは約49 kbpであった。サザンブロットハイブリダイゼーション法で検討したが、両ファージのゲノムには相同性がなく、遺伝的に異なるファージであることが判明した。

#### 7) ファージの構造蛋白質について知るために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で検討した。

S 1 ファージの場合、主なバンドが3本、そのほか少なくとも、11本のバンドが観察された。



S 2 ファージの場合、主なバンド 3 本、そのほか少なくとも、10 本のバンドが観察された。

8) 食品添加物の保存料として公定されているオルトフェニルフェノールの S 1 および S 2 ファージに対する作用について研究し、次のことが分かった。

(1) 宿主菌に対して、 $6 \times 10^{-4}$  M で殺菌的に作用する。(2)  $2 \times 10^{-3}$  M という高濃度において、ファージを不活化しない。(3) また、ファージの吸着を阻害しない。(4) 一方、ファージの増殖を阻害する。(5) S 1 ファージでは、低濃度 ( $2 \sim 4 \times 10^{-4}$  M) でファージ感染菌の早期溶菌を誘起する。(6) S 2 ファージでは、早期溶菌を誘起しない。

9) オルトフェニルフェノールの Escherichia coli の 5 つのファージ系 (T 1、T 3、T 4、T 5、 $\phi$  x 174)、Bacillus subtilis の 2 つのファージ系 (M 2、S P O 1) および Lactobacillus casei の J 1 ファージ系に対する作用について研究し、次のことが分かった。

(1) 宿主菌に対して、 $8 \sim 20 \times 10^{-4}$  M で殺菌的である。(2) 殺菌的濃度においてファージを不活化しない。(3) また、ファージの吸着を阻害しない。(4) 一方、ファージの増殖を阻害する。このとき、T 4、T 5、M 2、S P O 1、J 1 ファージでは、感染中心数が減少する。(5) T 4、T 5、J 1 ファージでは、ファージ感染菌の早期溶菌を誘起する。(6) J 1 ファージの場合は特に著しく、オルトフェニルフェノールを溶菌剤として用いて、J 1 ファージ感染菌の



細胞内ファージを計数することができる。

10) 37℃より高い温度の、宿主菌およびS1、S2ファージ増殖に対する影響について検討し、次のことが分かった。

(1) 菌の生育は、41℃ないし42℃で最も速い。(2) 43℃でも37℃より速い。(3) 50℃で完全に阻害される。(4) S1ファージの増殖は、43℃でほぼ完全に阻害され、45℃で完全に阻害される。(5) S2ファージの増殖は、50℃で完全に阻害される。(6) S1ファージの場合、43℃で培養することによってファージを制御できる可能性がある。

食塩の宿主菌およびS1、S2ファージ増殖に対する作用について、次のことが分かった。

(1) 菌の生育は、0.8Mで完全に抑えられる。(2) ファージの増殖は0.7Mで完全に阻害される。

更に、高濃度食塩によるコロニー形成能喪失およびファージ増殖阻害に対するベタインの影響について検討し、次のことが分かった。

(1) ベタインを添加するとコロニー形成能が回復する。(2) 高濃度食塩によるコロニー形成能の減少は、殺菌的なものではなく静菌的なものであると考えられる。(3) ファージ増殖阻害に対しては、影響しない。

温度と食塩の組合せによるファージ増殖の抑制作用について検討し、次のことが分かった。(1) S1ファージの場合、37℃に比べ42℃に上げると、より薄い濃度の食塩でファージ増殖を阻害することができる。(2) S2ファージの場合、42℃に上げててもファージ増殖阻害の食塩濃度は、変わらない。(3) 43℃に上げると、S1



ファージの増殖は、更に薄い濃度の食塩で阻害される。(4) S 2

ファージの場合は、ファージ増殖阻害の食塩濃度は変わらない。

- 1) S. H. Bauer and A. Novick: *Journal of Bacteriology*, 72, 200-201, 1959.
- 2) S. H. Bauer: *Importance of bacteriophages in fermentation processes*, *Int. J. Technol.*, 9, 231-235 (1963).
- 3) 市江元吉, 村田 亮, 松方啓三: "菌類と微生物", 協成堂出版, 昭和 28 年, 東京, pp. 1-176 (1953).
- 4) 森田良三, 河野啓三, 松方啓三編: "ウイルス学", 協成堂サイエンスライブラリー, pp. 100-105 (1957).
- 5) 村田 亮, 森田良三, 松方啓三編: "ウイルス学", 協成堂サイエンスライブラリー, pp. 100-105 (1957).
- 6) S. H. Bauer: "Bacteriophages", *Int. J. Technol.*, New York, pp. 413-513 (1963).
- 7) S. H. Bauer and A. Novick: *Importance of bacteriophages in fermentation processes*, *Int. J. Technol.*, 9, 231-235 (1963).
- 8) 協成堂サイエンスライブラリー: "菌類と微生物", 協成堂出版, 昭和 28 年, 東京, pp. 1-176 (1953).
- 9) 松方啓三: "菌類と微生物", 協成堂出版, 昭和 28 年, 東京, pp. 1-176 (1953).
- 10) 松方啓三, 中川八郎, 三浦啓三編: "菌類と微生物", 協成堂出版, 昭和 28 年, 東京, pp. 1-176 (1953).
- 11) S. H. Bauer: *The viruses and bacteriophages of*



- 1) S. Ogata: Bacteriophage contamination in industrial processes. Biotechnol. Bioengin., 22, Suppl. 1, 177~193 (1980).
- 2) L. Wünsche: Importance of bacteriophages in fermentation process. Acta Biotechnol., 9, 395~419 (1989).
- 3) 本江元吉、村田 晃、緒方靖哉: “発酵と微生物 II”、植村定治郎、相田 浩編、朝倉書店、pp. 1~108 (1970).
- 4) 保坂康弘、川瀬茂実、松井千秋編: “ウイルス図鑑”、講談社サイエンティフィク、pp. 609~620 (1972).
- 5) 村田 晃、添田栄一、猿野琳次郎: 乳酸桿菌バクテリオファージのプラーク生成に影響する因子. 農化、43, 311~316 (1969).
- 6) M. H. Adams: “Bacteriophages”, Interscience Publishers, New York, pp. 443~519 (1959).
- 7) M. Hongo and A. Murata: Bacteriophages of Clostridium saccharoperbutylacetonicum. Part III. Morphology of twelve HM-phages. Agric. Biol. Chem., 30, 292~295 (1966).
- 8) 微生物研究懇談会編: “微生物学実験法”、講談社サイエンティフィク、pp. 140~151 (1975).
- 9) 深見 章: “実験化学講座 I 下”、日本化学会編、丸善、pp. 384~385 (1957).
- 10) 泉 美治、中川八郎、三輪谷俊夫: “生物化学実験のてびき 3. 核酸の分離・分析法”、化学同人、pp. 1~6 (1986).
- 11) G. R. Wyatt: The purine and pyrimidine composition of



- deoxypentose nucleic acid. Biochem. J., 48, 584~590 (1951).
- 1 2) J. Marmur and P. Doty: Determination of base composition of deoxyribonucleic acids from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol., 5, 109~118 (1962).
- 1 3) P. Doty, H. Boedtker, J. R. Fresco, R. Haseikorn and M. Litt: Secondary structure in ribonucleic acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 45, 482~499 (1959).
- 1 4) T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook: In "Molecular Cloning: a Laboratory Manual". Cold Spring Harbor (ed.), New York, Cold Harbor laboratory, pp. 383~385 (1982).
- 1 5) Boehringer Mannheim : "DNA Labeling and Detection Nonradioactive". Boehringer Mannheim, Mannheim (1989).
- 1 6) B. Tacacs: Electrophoresis of proteins in polyacrylamide slab gels. In "Immunological methods". I. Lefkovits and B. Pernis (ed.), Academic Press, New York, pp. 81~105 (1979).
- 1 7) D. Hall: Electron densitometry of stained virus particales. J. Biophys. Biochem. Cytology, 1, 1~12 (1955).
- 1 8) D. E. Bradley: Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev., 31, 230~234 (1967).
- 1 9) S. E. Luria: "General Virology", John Wiley and Sons, New York, pp. 135~141 (1978).
- 2 0) J. Marmur and P. Doty: Heterogeneity in deoxyribonucleic acids. I. Dependence on composition of the configurational stability of deoxyribonucleic acids. Nature, 183,



1427~1429 (1959).

- 2 1) A. M. Kropinski: Bacteriophage DNA; Correlation of buoyant density, melting temperature, and the chemically determined base composition. J. Virol., 13, 753~756 (1974).
- 2 2) A. Murata: The inhibitory effects of pyrocarbonic acid diethyl ester on Lactobacillus casei and its phage J1; A novel strategy for phage control in technical fermentation processes. Acta Biotechnol., 5, 321~328 (1985).
- 2 3) 村田 晃: 食品防腐剤によるファージ感染 Lactobacillus casei 菌細胞の早期溶菌. 農化、47、217~222 (1973).
- 2 4) 村田 晃、池田光宏、光武隆久、添田栄一、猿野琳次郎: 食品防腐剤の Lactobacillus casei およびその J1ファージに対する影響. 農化、47、267~274 (1973).
- 2 5) A. Murata and T. Mitsutake: Growth inhibition of Lactobacillus casei phage J1 by dehydroacetate. Agric. Biol. Chem., 37, 1763~1764 (1973).
- 2 6) 村田 晃、白浦義則: パラオキシ安息香酸エステルによるファージ感染 Lactobacillus casei 菌細胞の早期溶菌. 農化、47、65~72 (1973).
- 2 7) A. Brown: A study of lysis in bacteriophage-infected Escherichia coli. J. Bacteriol., 71, 482~490 (1956).
- 2 8) W. C. Schneider: Phosphorus compounds in animal tissues. 1. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. J. Biol. Chem., 161,



293~303 (1945).

- 29) W. C. Schneider: J. Biol. Chem., 164, 747 (1946)
- 30) K. Burton: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J., 62, 315~323 (1956).
- 31) G. Ceriotti: Determination of nucleic acid in animal tissues. J. Biol. Chem., 214, 59~70 (1955).
- 32) Z. Baker, R. W. Harrison and B. T. Miller: J. Exp. Med., 611 (1941).
- 33) H. Schnabel, W. Zillig, M. Pfaffle, R. Schanabel, H. Michel and H. Delius: Halobacterium halobium phage  $\phi$ H. EMBO J., 1, 87~92 (1982).
- 34) H. Schnabel, E. Schramm, R. Schanabel and W. Zillig: Structural variability in the genome of phage  $\phi$ H of Halobacterium halobium. Mol. Gen. Genet., 188, 370~377 (1982).
- 35) W. G. Roth, M. P. Leckie and D. N. Dietzler: Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed Escherichia coli by betaine. Appl Environ. Microbiol., 54, 3142~3146 (1988).



## 謝

## 辞

本研究は、佐賀大学農学部応用生物科学科応用微生物学研究室で行ったものである。

この研究に当り、始終御懇篤な御指導を賜わり、また、原稿の御懇切な御校閲を頂きました村田 晃教授に深甚な感謝の意を捧げます。

また、御指導御討議を頂きました加藤富民雄助教授、鹿児島大学農学部大西 博教授、神田康三助教授に謝意を表します。

本研究に協力された 徳永 淳氏、山本純子氏、中原純子氏、清水昭子氏、吉永克則氏、田中宏一郎氏、池田勝徳氏、岩下和裕氏、西田豊彦氏、小林知恵氏に感謝します。

常に暖かい励ましを頂いた応用微生物学研究室の方々に心からお礼を申し上げます。



