Brevibacterium に属する L-グルタミン酸生産菌

バクテリオファージの研究 (第 5 報)*

抗生物質のファージ感染抑制作用

沖 俊一, 松井俊規, 赤星恭助, 原田良造 (三楽オーシャン株式会社八代工場)

昭和 39 年 9 月 2 日 受 理

I. 緒 言

L-グルタミン酸, アセトン・ブタノール, アミラーゼなどの細菌利用工業においては, バクテリオファージによる異常発酵に悩まされることがしばしばあるが, この防除対策として直接有効な一般的方法是未だ見出されていない。ファージ発生事後対策としてはファージ耐性株を分離使用するか, または全く異種の非感染菌を用いるのが常道とされている。しかしファージ耐性株の分離とファージの宿主域突然変異が繰返し起った場合には直接的な防除対策がなければ安全な操業を行うことは困難となる。そこで使用菌株の生育, 発酵に阻害を与えず混入ファージの作用を特異的に阻止する物質を界面活性剤 40 種, 金属封鎖剤 19 種, 抗生物質 18 種, 色素その他 15 種から検索した。この方面の研究としては乳酸菌によるチーズ製造においてリン酸塩⁽¹⁾が, アミラーゼ生産菌ファージにおいてはインドール⁽²⁾が工業的に有効であり, アセトン・ブタノール生産菌ファージは合成培地において, 特異的にクロラムフェニコールによって増殖が抑制⁽³⁾されるという報告があるに過ぎない。

筆者らは非イオン界面活性剤 (オレイルアルコール (EO)₁₆₋₂₄, PEG ジエステル), アニオン界面活性剤 (ナトリウムテトラオキシエチレンオレイルホスフェートなど), 金属封鎖剤 (リン酸塩, クエン酸塩, 蔞酸塩など), 抗生物質 (テトラサイクリン, クロラムフェニコール) を L-GA の生成を阻害しない濃度範囲で培地中へ添加

することによって, 特異的にファージ感染を抑制することを見出した。本報告では抗生物質のファージ感染抑制作用の工業的利用と作用機作について述べる。

II. 実験方法

使用菌株: *Brev. lactofermentum* No. 2256-YO-2 (以下 YO-2 と略)。

培地組成: グルコース 12% (種母培地は 5%), 尿素 0.8%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7 H₂O 0.04%, 味液 1.0%, ビタミン B₁ 200 γ/l, Mn²⁺ 及び Fe²⁺ 各 2 p.p.m., 7,8-ジアミノペラルゴン酸 25 γ/l (別殺菌を行い接種直前に培地へ添加する), pH 調節は 50% 尿素水のフィードによった。

バクテリオファージ: 第 2 報⁽⁴⁾に述べた P 401 及び P 465 無菌濾液。

供試抗生物質: 下記の抗生物質の原末, または原末の入手できなかったものは市販品を使用した。

ペニシリン (プロカインペニシリン G, 日本化薬), クロラムフェニコール (クロロマイセチン), マイトマイシン C (以上三共), カナマイシン (硫酸塩, 万有製薬), エリスロマイシン (大日本製薬), カルチノフィリン A (協和醸酵), ストレプトマイシン, ジヒドロストレプトマイシン, テトラサイクリン, オキシテトラサイクリン, クロルテトラサイクリン, ノボビオシン, アイロタイシン, オレアンドマイシン, ロイコマイシン, ビオマイシン, デキストロマイシン, クロモマイシン (以上武田薬工)。

培養方法: 培地 20 ml を 500 ml 容坂口フラスコに分注, 殺菌後, ルーフラスコにて 20 時間, 30° にて培養した YO-2 懸濁液を 1~2×10⁷ cells/ml となるように接種し, ファージ稀釈液及び抗生物質溶液を添加し, 30° にて振盪培養 (125 p. p. m., 8 cm) を行った。

分析方法: 菌の増殖度; 10 または 20 倍希釈液の

* Studies on the Bacteriophages of L-Glutamic Acid Producing Bacteria, *Brevibacterium* species. Part V. The Inhibition of Bacteriophage Multiplication by Antibiotics in L-Glutamic Acid Fermentation.

By Toshikazu OKI, Kyosuke AKAHOSHI, Toshinori MATSUI and Ryoza HARADA (Yatsushiro Factory, Sanraku-Ocean Co., Ltd.)

610 m μ における吸光度 ($-\log T$). L-GA の定量; *E. coli* グルタミン酸脱炭酸酵素によるワールブルグ検圧法. ファージ力価の測定; Adams の寒天 (ブイヨン) 重層法^(5,6). 核酸, 蛋白の分画と定量; Schneider の方法⁽⁷⁾に準じて分画を行い, DNA は Burton の改良ジフェニルアミン法⁽⁸⁾, RNA は Ceriotti の改良オルシノール法⁽⁹⁾, 蛋白は Gornall のビウレット法⁽¹⁰⁾によった.

III. 実験結果及び考察

1. ファージ感染抑制抗生物質の検索

一次スクリーニングは寒天重層法における上層軟寒天中へ, それぞれの抗生物質を 0.1~10 γ /ml の濃度となるように加え, ファージ P 465, 5×10^2 particles/ml を指示菌 YO-2 と共に混合してプレートした. 30° にて 24 時間培養後, 形成されたプラークを計測しプレート効率によって, ファージ感染阻害 (プラーク形成阻害) 物質を検索し, 第 1 表を得た. テトラサイクリン, オキシテトラサイクリン, クロラムフェニコール, クロルテトラサイクリンは YO-2 の増殖を阻害しない 1~2 γ /ml の

濃度で著しくプラーク形成を抑制したので, 液体培養による二次スクリーニングを行った. すなわち, 20 ml の本培養培地へ YO-2 を 1×10^7 cells/ml 接種し, 同時に上記の抗生物質溶液を 1~2 γ /ml となるように添加し, ファージ P 401 を接種時 (0 時間) に 10^2 particles/ml, または 7 時間に 2×10^2 particles/ml 添加して 30° にて振盪培養し経時的に比濁を測定し, 72 時間で培養を終了 L-GA を定量した (第 2 表). テトラサイクリン, クロラムフェニコールが L-GA の生成に影響なくファージ溶菌現象を阻止することを認めたが, これらの薬剤の効果はファージ感染時期, 感染率によって左右される傾向がみられるので, さらに詳細に検討を進め, 工業的に, より効果的に使用する方法について考察した.

2. ファージ感染率 (P/B 比) とテトラサイクリンの関係

本培養培地 20 ml を 500 ml 容坂口フラスコに分注殺菌し, YO-2 を 3×10^7 cell/ml 接種し, 同時にテトラサイクリン 1 γ /ml 及びファージ P 465 を P/B 比 10^{-2} ,

第 1 表 寒天重層法によるプラーク形成阻止抗生物質の検索

抗生物質	濃度 (γ /ml)	宿主菌 の増殖	プラーク数 (particles/ plate)	プレー ト効率 (%)	抗生物質	濃度 (γ /ml)	宿主菌 の増殖	プラーク数 (particles/ plate)	プレー ト効率 (%)
対 照 (無添加)		+	520	100	対 照 (無添加)		+	500	100
ペニシリン (unit/ml)	4	±	0	0	デキストロマイシン	5	—	—	—
	2	±	0	0		1	±	0	0
	0.2	+	531	100		0.2	±	0	0
ストレプトマイシン	5	—	—	—	オレアンドマイシン	5	±	0	0
	1	—	—	—		1	±	200	40
	0.2	+	528	100		0.2	±	361	72
ジヒドロ ストレプトマイシン	2	±	0	0	ノボビオシン	20	+	402	80
	1	±	0	0		5	+	508	100
	0.2	+	166	32		2	+	512	100
クロラム フェニコール	10	±	0	0	クロモマイシン	5	—	—	—
	2	+	131	25		1	—	—	—
	1	+	322	62		0.2	±	0	0
テトラサイクリン	0.2	+	421	81	カナマイシン	5	±	0	0
	2	+	198	38		1	±	0	0
	1	+	260	50		0.2	±	90	18
オキシ テトラサイクリン	0.2	+	359	69	エリスロマイシン	1	—	—	—
	10	±	31	6		0.2	±	235	47
	5	±	83	16	ビオマイシン	1	±	415	83
クロル テトラサイクリン	1	+	280	54		0.2	+	511	100
	0.2	+	426	82		1	—	—	—
アイロタイシン	10	—	—	—	マイトマイシン C	0.5	+	491	98
	5	±	0	0		0.1	+	504	100
	1	±	0	0	カルチノフィリン A	1	—	—	—
	0.2	±	99	19		0.5	+	503	100
						0.1	+	496	99

宿主菌: YO-2, バクテリオファージ: P 465, 500 particles/plate

第2表 ファージ感染 L-GA 発酵における抗生物質の影響

種 類	濃 度 (γ /ml)	時 期 (hrs)	ファージ添加 量 (particles/ml)	比 濁 ($\times 20$)			L-GA (%)
				6	12	24	
対 照 (無添加)			無 添 加	0.18	0.65	0.78	43.8
			0 1×10^2	0.13	0.15	0.10	0.8
			7 2×10^2	0.18	0.57	0.32	2.5
テトラサイクリン	1.0		無 添 加	0.10	0.36	0.75	42.8
			0 1×10^2	0.09	0.31	0.70	40.1
			7 2×10^2	0.10	0.40	0.78	43.4
クロル テトラサイクリン	2.0		無 添 加	0.25	0.64	0.75	29.2
			0 1×10^2	0.24	0.44	0.28	1.8
			7 2×10^2	0.25	0.50	0.70	25.8
オキシ テトラサイクリン	1.0		無 添 加	0.12	0.45	0.85	42.9
			0 1×10^2	0.10	0.32	0.50	2.9
			7 2×10^2	0.12	0.36	0.75	39.2
クロラム フェニコール	1.0		無 添 加	0.12	0.40	0.71	40.8
			0 1×10^2	0.11	0.36	0.65	32.8
			7 2×10^2	0.16	0.38	0.70	40.4
ノボビオン	25		無 添 加	0.30	0.68	0.85	26.5
			0 1×10^2	0.25	0.10	0.25	0.9
			7 2×10^2	0.30	0.62	0.24	4.8

宿主菌: YO-2, ファージ: P 401, 30° 振盪培養

第1図 ファージ感染率とテトラサイクリンの関係
宿主菌: YO-2, ファージ: P 465, テトラサイクリン: 1 γ /ml, 30° 振盪培養 (G 培地)

- 添加ファージ数 (particles/ml)
- テトラサイクリン無添加, ファージ感染中心数 (20 hrs, particles/ml)
- テトラサイクリン 1 γ /ml 添加, ファージ感染中心数 (20 hrs, particles/ml)
- L-GA (96 hrs, %)
- 比濁 ($\times 20$, 20 hrs)
- ファージ無添加 (対照)

10^{-8} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 1.7×10^{-9} となるように加えて, 30° にて 96 時間振盪培養を行い, 20 時間の比濁及びファージ感染中心数, 96 時間の L-GA を

定量し第1図に示した。テトラサイクリン無添加の場合には添加ファージは P/B 比に関係なく, 20 時間後に 10^{11} particles/ml に増加するが, テトラサイクリン 1 γ /ml の存在によって, ファージ増殖は特異的に抑制される。しかしながら P/B 比が大きくなるに従って, 感染中心数の増加率は漸増し抑制効果は減ずる。YO-2 の増殖速度に比べファージ増殖速度が速いために, P/B 比の大きい場合には溶菌が起り L-GA の生成が阻害を受ける。テトラサイクリン 1 γ /ml で抑えるファージ感染率すなわち P/B 比の限界は $10^{-5} \sim 10^{-6}$ であった。

工業的にはファージ感染は本培養

のみならず, しばしば種母培養において発生し, かかる種母を用い本培養では数時間にして顕著な溶菌現象が起ることを経験している。そこであらかじめテトラサイクリン 0.5~1 γ /ml を添加した種母培養において, 菌が 1×10^9 cells/ml (比濁 $\times 10$, 0.4) に増殖した時期にファージ P 401 が 10^3 , 10^4 , 10^6 particles/ml 混入した種母を本培養へ添加した場合の経過を第3表に示した。P/B 比 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ のファージ感染がある種母培養の初期にテトラサイクリンを 0.5~1.0 γ /ml 添加することによって本培養における溶菌を阻止したが, P/B 比 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ 感染の場合には溶菌を抑えることは不可能で, P/B 比とテトラサイクリンの関係で述べた如く, ファージ感染抑制作用は混入ファージ数と菌数の割合によって左右される。従って P/B の低い時期, すなわち発酵初期に低濃度使用することが安全かつ効果的に異常発酵を防止する方法と考えられる。

3. Jar fermentor におけるファージ感染 L-GA 発酵に対する抗生物質の効果

20 l 容ガラス製 Jar fermentor を用いてテトラサイクリン及びクロラムフェニコール 0.8 γ /ml 添加によるファージ感染 L-GA 発酵の経過をみた。ブイヨン斜面に 24 時間培養した YO-2 菌体を 500 ml の種母培地を分注殺菌した 5 l 坂口フラスコへ接種し, 30° にて 15 時間振盪培養 (125 r.p.m., 8 cm) 後, 10 l の本培養培地 (グルコース 14%, 尿素 0.8%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4

第 3 表 ファージ感染 L-GA 種母培養に対するテトラサイクリンの効果

種 母 培 養				本 培 養				
テトラサイ クリン添加		ファージ添加		種母添加 時比濁 (×10)	比 濁 (×20)			
時間 (hrs)	濃度 (γ/ml)	時間 (hrs)	量 (particles/ ml)		12	20	36	60 (hrs)
無 添 加		無 添 加		0.52	0.20	0.50	0.70	0.68
		9	10 ²	0.55	0.17	0.11	0.08	0.12
		9	10 ⁴	0.54	0.09	0.08	0.11	0.16
7	0.5	9	10 ⁶	0.56	0.06	0.05	0.15	0.26
		無 添 加		0.52	0.10	0.16	0.52	0.68
		9	10 ²	0.50	0.10	0.15	0.58	0.70
7	1.0	9	10 ⁴	0.49	0.09	0.10	0.30	0.63
		9	10 ⁶	0.45	0.07	0.09	0.14	0.22
		無 添 加		0.42	0.07	0.16	0.52	0.71
7	1.0	9	10 ²	0.45	0.08	0.18	0.52	0.73
		9	10 ⁴	0.44	0.08	0.17	0.40	0.74
		9	10 ⁶	0.48	0.07	0.16	0.16	0.35

宿主菌: YO-2, ファージ: P 401, 30° 振盪培養, 種母添加量: 5%

第 2 図 ファージ感染 L-GA 発酵に対する抗生物質の効果 (Jar Fermentor)

宿主菌: YO-2, ファージ: P 465 (10 particles/ml, 0 時間添加), テトラサイクリンまたはクロラムフェニコール 0.8 γ/ml, 0 時間添加.

—○—: L-GA —●—: 比濁 (O.D. ×20) ...▲...: 残糖 (D.S. %) —●—: ファージ感染中心数 (particles/ml)

・7 H₂O 0.04%, Fe²⁺ 及び Mn²⁺ 2 p.p.m., ビオチン 2.5 γ/l, C.S.L. 0.5%, ビタミン B₁ 100 γ/ml) を含む Jar fermentor へ 5% となるように種母を添加した. 種母添加と同時にファージ P 465 を 10 particles/ml 及びテトラサイクリンまたはクロラムフェニコール溶液を 0.8 γ/ml となるように加えた. 30° にて通気 (5 l/min), 攪拌 (500 r. p. m.) 培養を行い, 比濁 0.6 前後で 37° に温度を上昇し, pH 調節は 50% 尿素水のフィードによった. 残糖はソモギー変法により定量し, ファージ増殖は培養液中の感染中心数によって示した. 第 2 図の発酵経過の如くテトラサイクリン 0.8 γ/ml によってファージ増殖は特異的に抑制され溶菌は阻止されて正常発酵と同様の経過をたどった. クロラムフェニコールもファージ増殖を抑制したが, 菌の生育を阻害したために L-GA の生成はやや劣った. Park, Park⁽¹¹⁾ によればエリスロマイシンは *Staphylococcus aureus* のファージ増殖をその静菌的濃度で抑えるがエリスロマイシン耐性菌を分離して検しても, この抗生物質はファージ増殖を抑えると言う. このような抗生物質耐性菌でのファージ増殖抑制の例は RNA ファージ⁽¹²⁾ でも知られているので, テトラサイクリンまたはクロラムフェニコール耐性菌を分離して, これらの抗生物質を高濃度使用して完全にファージ増殖を阻止する方法が考えられる.

4 テトラサイクリンのファージ感染抑制作用の機作

抗生物質の遊離ファージ不活性化については Cohen⁽¹³⁾ がストレプトマイシン, ジヒドロストレプトマイシンの作用について述べているし, Altenbern⁽¹⁴⁾, Masry⁽¹⁵⁾ はオーレオマイシンがファージ吸着速度を低下させ潜伏期, 放出価に影響を与えることを報告している. 宿主菌の生育阻害濃度においてファージの増殖もまた阻害することは多く知られている^(16,17) が, 菌の生育を阻害しない濃度でファージの増殖を抑える

例はほとんどない。ファゴスタチン⁽¹⁸⁾が *E. coli* の T3 ファージ増殖を抑制し、アクチノマイシン⁽¹⁹⁾が *E. coli* T2 ファージの増殖を抑え、菌は 100 r/ml でも影響がなく、ファージ放出価は 30 r/ml で対照の 43 から 11 に減少すると言う。ファージ増殖を阻害する物質の多くは菌の静的濃度においてのみ有効で、*Brevibacterium*-ファージ系におけるような発酵に影響を与えないテトラサイクリンの低濃度でファージ感染を特異的に抑制し、工業用培地に応用した例は少なく、その作用機作について若干の知見を得た。

1) 遊離ファージに対するテトラサイクリンの影響

ファージ P 465 溶菌液を G 培地にて 1×10^8 /ml に希釈し、抗生物質を 50, 100 r/ml となるように加えて、 10° 及び 30° に放置して経時的に残存ファージ力価を測定した(第 3 図)。テトラサイクリンは作用濃度、時間、温度にかかわらず、顕著な失活作用を与えず、低濃度、短時間の作用では全く遊離ファージに影響を与えない。

第 3 図 遊離ファージに対するテトラサイクリンの影響 (G 培地)

始発ファージ力価: P 465, 2.5×10^8 particles/ml
 温度: 30° (—●—), 10° (---●---)
 テトラサイクリン: —●— 0 (対照), —○— 2 γ /ml,
 —▲— 50 γ /ml, —○— 100 γ /ml

2) ファージ吸着に対するテトラサイクリンの影響

YO-2 を G 培地へ 2×10^8 cells/ml となるように懸濁し、テトラサイクリンを 10~100 r/ml 加え、直ちに P 465 ファージを 3×10^7 particles/ml となるように加えて、 30° にて振盪、吸着を行い、経時的に残存遊離ファージを定量した。第 4 図に示すように 100 r/ml で吸着速度がやや低下したが、YO-2 の増殖最小阻止濃度 (2 r/ml) ではファージ感染抑制を顕著に与えるほどの吸着阻害は認められなかった。

第 4 図 ファージ吸着に対するテトラサイクリンの影響

G 培地, 30° で振盪吸着
 ファージ: P 465, 3×10^7 particles/ml.
 宿主菌: YO-2, 2×10^8 cells/ml (MOI=0.15)
 テトラサイクリン: —●— 0 (対照), —○— 2 γ /ml,
 —○— 10 γ /ml, —▲— 50 γ /ml, —■— 100 γ /ml.

第 5 図 一段階増殖実験

3) ファージ増殖に対するテトラサイクリンの作用

以上の結果からテトラサイクリンは DNA の注入、菌体内における新生ファージの増殖及び放出のいずれかの段階を阻害するものと考えられる。一段階増殖実験に準じた第 5 図の方法に従って、ファージ感染菌にテトラサイクリンを作用させて新生ファージの合成、放出を遊離ファージ数、菌体内ファージ数より検討した。なお、クロロホルムは遊離ファージに対して全く作用しないことをあらかじめ確認した。第 6 図の結果のように 2.5 r/ml の添加によって、菌体内ファージの合成は阻止され、新生ファージの放出は認められなかった。0.5 r/ml では菌体内ファージ合成はテトラサイクリン無添加の場合と同様合成されるにもかかわらず、新生ファージの放出価は対照の 15.4 に比べ 10.8 に低下し、潜伏期も対照の

第 6 図 ファージ増殖に対するテトラサイクリンの作用

宿主菌: YO-2, ファージ: P 465, 30°, 15 分吸着
 テトラサイクリン添加 (0 分): —●— 0 (対照), —▲— 0.1
 γ/ml, —■— 0.5 γ/ml, —○— 2.5 γ/ml
 遊離ファージ (—), 菌体内ファージ (.....)

55 分に比べ 80 分に延びたことは、プロフラビンなどで知られている溶菌酵素形成阻害による新生ファージの放出抑制によるものと考えられる。0.1 γ/ml の添加では全く新生ファージの合成、放出は抑制されず、放出価は 16, 潜伏期 60 分であった。これらの結果からテトラサイクリンは核酸、蛋白合成に作用するものと推定されるので、ファージ感染 L-GA 発酵とテトラサイクリン添加による培養液中の DNA、蛋白量を定量した。

4) DNA、蛋白合成に対するテトラサイクリンの影響

A) 正常及びファージ感染 L-GA 発酵における DNA、蛋白合成に対するテトラサイクリンの作用: 20 ml の G 培地を含む 500 ml 坂口フラスコへ YO-2 を接種 (2×10^7 /ml), ファージ P 465 (1~100/ml) 及びテトラサイクリン (1 γ/ml) を添加して経時的に培養液 1 ml をサンプリングして第 7 図の方法に従って核酸、蛋白の分画、定量を行った第 8 図の結果を得た。

ファージ感染発酵はファージ DNA と考えられる DNA 量の異常増加が認められ、蛋白量は溶菌と共に一時減少したが、耐性株の二次増殖に伴って菌体蛋白の合成が起った。テトラサイクリン添加によって正常発酵の DNA、蛋白合成もかなり抑制を受けるが、ファージ感染発酵へ

1 γ/ml 添加することによって DNA、蛋白合成は正常発酵と同様の経過となり溶菌は阻止された。

B) 一段階増殖実験による多重感染菌の DNA、蛋白合成に対するテトラサイクリンの作用: ファージ P 465 と YO-2 を MOI 20 となるように 30° にて G 培地中で混合しファージ感染の種々の段階でテトラサイクリン 10 γ/ml を添加し、経時的に感染液中の DNA 及び蛋白を定量した (第 7 図)。DNA 合成に対するテトラサイクリンの作用は第 9 図のとおりである。非感染菌の DNA 量に比較してファージ感染菌の DNA 合成は非常に旺盛で新生ファージの放出が起る 70~80 分まで直線的に増加し 65 γ/ml に達した。この DNA はファージ DNA と考えられる。吸着の終了 20 分までにテトラサイクリンを添加すると一時的に DNA が

第 7 図 ファージ感染菌の核酸、蛋白分画

増加するが、その後合成は抑制された。新生ファージの成熟段階 (40~60 分) に加えた場合には短時間で阻止された。従ってテトラサイクリンはクロラムフェニコール

の T2 ファージ感染⁽²⁰⁾に対するような DNA 合成の初期のみに特異的に作用するのではなく、一旦 DNA 合成

フェニコールの阻害機作より複雑な現象と考えられる。

一方、蛋白合成についてみると第 10 図のごとく、ファージ感染菌及び非感染菌のいずれにおいても、テトラサイクリン添加によって短時間に蛋白合成は阻害を受け、急速に蛋白量が減少するのが特徴的であった。感染初期 (吸着段階) で作用させると、一時的な蛋白の減少後直線的に増加し、テトラサイクリン添加非感染菌の菌体蛋白の合成と全く同じ曲線が得られた。細胞に新生ファージが成熟する段階でテトラサイクリンが作用すると、蛋白減少に引続いて起る増加はほとんど認められなかった。テトラサイクリン無添加感染菌では 90~100 分にファージ溶菌を伴って蛋白が減少したが、テトラサイ

第 8 図 ファージ及びテトラサイクリン添加 L-グルタミン酸発酵における DNA 及び蛋白量の変化

宿主菌: YO-2, ファージ: P 465, 30° 振盪培養

曲線 1: 対照 (正常発酵)

- // 2: テトラサイクリン 0.5 γ/ml 添加, ファージ無添加
- // 3: " 1.0 " " "
- // 4: " 2.0 " " "
- // 5: ファージ P 465 1 particles/ml 添加, テトラサイクリン無添加
- // 6: " 10 " " "
- // 7: " 100 " " "
- // 8: ファージ P 465 1 particles/ml 添加, テトラサイクリン 1.0 γ/ml 添加
- // 9: " 5 " " "
- // 10: " 10 " " "

第 9 図 ファージ感染菌の DNA 合成に対するテトラサイクリンの作用

宿主菌: YO-2 (7.5×10^6 cells/ml)

ファージ P 465 (3.8×10^6 particles/ml)

MOI=20

G 培地, 30° 振盪感染

—○—及び—●—: テトラサイクリン無添加,
—●—: 10 γ/ml となるように図の右側に示した時間 (分) に添加した。

..... ファージ非感染菌 — 感染菌

第 10 図 ファージ感染菌の蛋白合成に対する
テトラサイクリンの作用
反応条件, 記号はすべて第 9 図に同じ。

クリン添加感染菌における初期の蛋白減少はファージによる溶菌と異なる現象と考えられる。*E. coli* T 系ファージ感染に対するクロラムフェニコールの作用が DNA の合成過程それ自体の阻害でなく, ファージ DNA の合成に必要な酵素蛋白の合成阻害を通じて間接的に起ることが知られているが^(20,21), テトラサイクリンによるファージ感染抑制作用が, クロラムフェニコールと同じ作用機作によるものかどうかはさらに詳細な検討が必要である。

IV. 要 約

著しいプラーク形成阻害作用を有したテトラサイクリン及びクロラムフェニコールをファージ感染 L-GA 発酵へ低濃度 (1~2 μ /ml) 添加することによって, 宿主菌の生育, L-GA の生成に影響なく特異的にファージ増殖を抑制し, ファージの被害を防止した。しかしながら, テトラサイクリンのファージ抑制作用は P/B 比に左右されるので, 工業的には発酵初期のファージ汚染ができるだけ少ない時期に低濃度使用することが有効であることを知った。

この作用機作は遊離ファージの失活, 吸着阻害ではなく, 新生ファージの増殖抑制であって, テトラサイクリンの濃度が低い場合には放出価の減少, 潜伏期の延長として現われるが, 濃度が高くなると菌体内ファージの合成は完全に阻止される。ファージ感染菌の DNA 合成は旺盛で, 非感染菌の 2 倍近い増加を示して, ファージ感

染のいずれの段階にテトラサイクリンを作用させても, 短時間に合成が抑制された。そして蛋白合成はテトラサイクリン添加によっていずれの場合も急速な減少が起るが, 吸着段階までに添加した場合には一時的な減少後, 直線的に蛋白増加が認められ溶菌が阻止された。

終りに臨み抗生物質を恵与くださり, 終始御指導を賜りました九州大学本江元吉教授に深謝申し上げます。また, 本発表を許可されました当社鈴木三千代社長並びに御指導, 御鞭撻をいただきました当社中央研究所長尾崎浅一郎博士, 同次長宮地昇博士に謝意を表します。

(本報告は昭和 39 年 4 月 25 日の日本農芸化学会関西支部例会, 及び昭和 39 年 7 月 20 日の第 10 回アミノ酸・核酸集談会にて発表したものである。)

- (1) V. W. Kadis, F. J. Babel : *J. Dairy Sci.*, **45**, 486 (1962).
- (2) 浮田富蔵 : 日本特許公告, 昭 32-1094.
- (3) M. Hongo, A. Murata : *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 190 (1964).
- (4) 沖 俊一, 松井俊規, 赤星恭助, 原田良造 : 本誌, **38**, 192 (1964).
- (5) M. H. Adams : *Method in Medical Research*, **2**, 1 (1950).
- (6) 沖 俊一, 松井俊規, 赤星恭助, 原田良造 : 本誌, **38**, 376 (1964).
- (7) W. Schneider : *J. Biol. Chem.*, **161**, 293 (1945).
- (8) K. Burton : *Biochem. J.*, **62**, 315 (1956).
- (9) G. Ceriotti : *J. Biol. Chem.*, **214**, 59 (1955).
- (10) A. G. Gornall, C. S. Bardawill, M. M. David : *ibid.*, **177**, 751 (1949).
- (11) B. Park, H. R. Park : *Korean Med. J.*, **4**, No. 11, 53 (1959); *Chem. Abst.*, **54**, 10065a (1960).
- (12) T. D. Brock : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **9**, 184 (1962).
- (13) S. S. Cohen : *J. Biol. Chem.*, **168**, 511 (1947).
- (14) R. A. Altenbern : *J. Bact.*, **65**, 288 (1953).
- (15) F. L. G. Masry : *J. Egypt. Med. Assoc.*, **36**, 299 (1953).
- (16) W. J. Elford : *J. Gen. Microbiol.*, **2**, 205 (1948).
- (17) D. Jones : *J. Bact.*, **50**, 341 (1945).
- (18) N. Higo : *Japan J. Microb.*, **2**, 3 (1958).
- (19) M. Sekiguchi, A. Nakata, J. Kawamata : *Nature*, **189**, 246 (1961).
- (20) J. Tomizawa, S. Sunakawa : *J. Gen. Physiol.*, **39**, 553 (1956).
- (21) L. V. Crawford : *Virology*, **7**, 359 (1959).