L-グルタミン酸生産菌 *Microbacterium ammoniaphilum* の

ファージに関する研究 (第 3 報)*

(その 1) ファージ耐性株について

(その 2) 溶原菌株の確認

瀬戸 進, 大沢岳義, 山本外男 (旭化成工業株式会社食品工場)

昭和 39 年 5 月 6 日 受 理

(その 1) ファージ耐性株について

緒 言

発酵工業におけるバクテリオファージの被害を防ぐためには、宿主菌からそのファージに耐性化した菌株を分離し、生産用菌株として用いるのが有力な方法とされている。ファージ耐性菌のできる機構としては、Luria ら⁽¹⁾がファージ感受性から耐性への変異は適応的な変化ではなく、ファージには無関係な遺伝的变化であるとしたように、一般に自然変異で発生するというのが通説とされている。また耐性獲得の機構としては細胞壁構造の変化が起こってファージが吸着できなくなる場合と菌が溶原化して免疫を獲得する場合⁽²⁾とが挙げられる。特に工場生産においては得られた耐性株の発酵能が問題にされる。阮⁽³⁾は L-グルタミン酸生産菌ファージの耐性株について、北原ら⁽⁴⁾はアミラーゼ生産菌ファージの耐性株について、原株に劣らぬ生産能を有すること、また木下ら⁽⁵⁾はアセトンプタノール生産菌ファージの耐性株は原株と異なり発酵能に変動がみられることを報告している。著者らも L-グルタミン酸生産菌 *Microbacterium ammoniaphilum* のファージ⁽⁶⁾を用い、各ファージ耐性株を分離し L-グルタミン酸生産能を検討したのでその結果を報告する。

実 験 方 法

使用菌株 : *Microbacterium ammoniaphilum*-A およびそのファージ耐性株。

* Studies on Bacteriophages for L-Glutamic Acid Producing Bacterium, *Microbacterium ammoniaphilum*. Part III. (1) On the Glutamic Acid Productivity of Resistant Strain. (2) Confirmation of Lysogenicity. By Susumu SETO, Takeyoshi OSAWA and Sotou YAMAMOTO (Foodstuff Plant, Asahi Chemical Industry Co., Ltd.)

ファージ : 第 1 報⁽⁶⁾に記した P-1, P-2, P-3, P-4, P-5.

発酵試験 : ブイヨン寒天斜面 24 時間培養菌の 3 白金耳を 500 ml 容三角フラスコに 150 ml 宛分注した 5-5 培地 [C. S. L. 5%, アミノ酸液 (小麦グルテン加水分解液から L-グルタミン酸を採取した残液) 5%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, pH 7.0] に接種して, 30° で 20 時間回転振盪培養を行ない種菌液とした。500 ml 容坂口フラスコに 100 ml 宛分注した M 培地 (グルコース 5%, urea 1.2%, KH_2PO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, L-シスチン 100 ml/l, ビオチン 1.5 γ /l, pH 6.5) に種菌液を 2 ml 宛接種して 30° に 60 時間振盪培養を行ない, その発酵液を分析に供した。

ファージ耐性菌の分離 : 指示菌 (5×10^9 こ/ml) とファージ (10^9 こ/ml) とを 0.1 ml 宛ブイヨン培地 9.8 ml に接種して 30° で培養し, 二次増殖した菌を再びブイヨン培地に継代培養してその一部をブイヨン寒天平板に塗布して培養し, 生じた単コロニーを拾い, さらに単コロニー継代を 5 回くり返した後スポット法⁽⁶⁾, 寒天重層法により耐性を確認した。

分析方法 : L-グルタミン酸は *E. coli crooks* C-6 の L-グルタミン酸炭酸酵素を用いるワールブルグ検圧法により, 糖は赤血塩還元法にもとづくオートアナライザー法により, pH は東亜電波 HM-5 A 型ガラス電極 pH メーターにより, 濁度は発酵液を水で 10 倍に希釈し日立 EPO-B 型光電光度計を使用して 660 m μ における吸光度により測定した。

実験結果および考察

ファージ耐性株の発酵試験 : 各ファージ耐性株および原株の L-グルタミン酸生成試験の結果は第 1 表に総

第 1 表 耐性株の発酵試験

分析項目 菌株	添加フ ァージ	pH	O. D.	L-GA (mg/ml)	Rs (mg/ml)
R _{P-1}	P-1	5.45	0.565	23.3	1.1
	—	5.47	0.570	23.5	1.2
R _{P-2}	P-2	5.44	0.566	23.1	1.1
	—	5.46	0.567	23.0	1.1
R _{P-3}	P-3	5.48	0.530	22.8	1.1
	—	5.47	0.527	22.9	1.2
R _{P-4}	P-4	5.45	0.552	23.1	1.1
	—	5.43	0.550	23.3	1.1
R _{P-5}	P-5	5.42	0.531	23.1	1.1
	—	5.42	0.520	23.3	1.1
対 照	—	5.45	0.527	23.3	1.1

(上表数字は 2 連の結果の平均値である)

M 培地, ファージ: 各ファージ (5×10^6 こ/ml) 2 ml 添加,
30°, 振盪培養 60 時間

R: 耐性株 L-GA: L-グルタミン酸 Rs: 残糖

括したが, 各ファージ耐性株共に原株に比べ特別に変わった現象を示さず, 正常の pH, 濁度, 糖消費, L-グルタミン酸生成を示し, 多量のファージ共存の状態においても同様に正常な発酵が可能であることが判明した。

(その 2) 溶原菌株の確認

緒 言

ある種のバクテリオファージは, その DNA を宿主に注入した後正常の増殖過程を経ることなく, そのままその DNA が宿主の染色体 DNA の一定の部位に定着し, 宿主の分裂増殖と歩調を合せていくことがある。このようにファージ DNA が宿主の染色体に定着する過程を溶原化という。溶原化された宿主は何回か分裂を重ねるうちに, そのうちの 1 個の菌体が崩壊して多数のファージを放出することがある。従って溶原菌の培養液中には, 溶原化したのと同じ種類のファージが産生されているのが普通である。このようにファージを産生する潜在能力も有する菌を発酵工業に使用することは非常に危険である。ある種の細菌がファージを産生する現象については古くから知られ, Gildmeister ら⁽⁷⁾は *E. coli* 88 について, Bordet⁽⁸⁾は *E. coli* Lisponne and Carrire 株について, また Cowles⁽⁹⁾は *B. megaterium*, *B. anthracis*, *B. subtilis*, *Cl. tertium* 等の有孢子細菌のファージ産生能を証明した。著者らも L-グルタミン酸生産菌 *Microbacterium ammoniaphilum* のファージについて研究を進めてるうちに, *Microbacterium ammoniaphilum*-B⁽⁶⁾の培養液中に常にファージが産生されていること, しかもこのファージは著者らがすでに分離した P-5 と全く同

一であることも判明した。さらに溶原性の確証を得るために, 種々な方法により検討を行なった結果, *Microbacterium ammoniaphilum*-B が溶原株であることが判明したので報告する。

実 験 方 法

使用菌株と菌液の調製: *Microbacterium ammoniaphilum*-A および B⁽⁶⁾の寒天斜面 24 時間培養菌の 1 白金耳をブイヨン培地 5 ml 分注した試験管に接種して 30° にて 15~20 時間培養した。

ファージの定量: 第 1 報⁽⁶⁾に記した寒天重層法による。

実験結果および考察

溶原性の証明

(a) 単コロニー継代培養による方法: *Microbacterium ammoniaphilum*-B を生理食塩水で希釈し (5×10^2 こ/ml), その 0.1 ml をブイヨン寒天平板に加えガラス棒でよく混ぜ 30° の恒温器で 48 時間培養した。平板上に生育した単コロニーを拾い, 再び生理食塩水の少量に懸濁し, 同様な継代培養を 20 回繰り返した。各回の操作で得られた単コロニーを 20 個宛拾い, 各コロニーをブイヨン培地に接種して 1 夜培養後適宜ブイヨン培地で希釈して, 指示菌に *Microbacterium ammoniaphilum*-A を用いて寒天重層法によりファージ数を測定した。その結果, 継代回数には無関係に拾い上げたコロニーすべての培養液からファージが検出され, しかも継代を繰り返してもファージ数が減少する傾向もみられず, 常に同程度のファージが検出されることから, さらに継代培養を続けてもファージは除き得ないと推定した。仮に *Microbacterium ammoniaphilum*-B が単に Phage carrier strain (溶原株とは区別されている) であるなら, 継代培養の繰り返してファージは消失するか, あるいは継代回数に従ってファージが減少する傾向がみられるはずであるが, 全くそのような現象は認められなかった。

(b) 混合培養におけるファージの産生: *Microbacterium ammoniaphilum*-A および B をブイヨン培地で 1 夜培養し, A-A, A-B, B-B の組合わせにして各菌 0.1 ml 宛を S 培地を 10 ml 宛分注した試験管に接種して 30° で 1 夜振盪培養した。培養後一部についてクロロホルム処理を行なって無菌化し, 指示菌は A, B 両株を用いて寒天重層法によりファージを測定した。第 2 表に示したように, ファージを産生したのは A-B, B-B 株の混合培養であり, 特に A-B 株混合培養において著しいファージ

第2表 混合培養によるファージ
産生能

Donor	Recipient	Plate用 指示菌	産生された ファージ
B	A	A	卅
		B	—
	B	A	卅
		B	—
A	A	A	—
		B	—
	B	A	卅
		B	—

A : *Microbacterium ammoniaphilum*-A

B : " " -B

卅 : 10^7 こ/ml 以上 卅 : 10^5 こ/ml 以上

した。これらの結果はAとB株間にはファージ donor-recipient の関係が成り立つことを示すものである。

(c) 追加感染に対する免疫性 : *Microbact. ammoniaphilum*-B の単コロニー 17 個を拾い、各々をA株と混合培養した。培養後クロロホルム処理を行ない、あらかじめブイヨン寒天平板に塗布した A, B 両株に処理液

産生が認められた。さらに培養液中にファージが産生されていて、寒天重層法で指示菌としてA株を用いなければファージの検出が不可能になることが判明

を1滴落し、15 時間培養後溶菌の有無を検べた。第1図に示したように、混合培養液で溶菌したのはA株のみであり、B株は全く溶菌しなかった。すなわち、B株は混合培養液中に産生されたファージには一種の耐性を有するかのような挙動を示した。しかも (b) で明らかにしたように、このファージはB株より産生されたものであるから、B株は同種のファージの追加感染に対して免疫になっていることを示すものである。

(d) Cross brushing method : *Microbact. ammoniaphilum*-A およびBをブイヨン培地で混合培養し、クロロホルム処理した液と P-1 ファージを各々ブイヨン寒天平板上に線状に引く、それが培地に吸込まれた後AおよびB株のブイヨン培養液を各々に直交させて引く。また別のブイヨン寒天板には同様にAおよびB株を縦に引き、それにもう一度AおよびB株を直交させて引き、30° で 15 時間培養し、それらの交差部分における溶菌の状態を観察した。第2回に示したように、左図では P-1 ファージの場合はAおよびB株との交差部分は

完全に溶菌して、両株に対して溶菌性のファージであることを示しているが、混合培養液の場合はA株との交差部分に溶菌がみられるが、B株との交差部分は全く溶菌されていない。また右図ではAおよびB株の交差で溶菌のみられたのはAとBの交差部分であり、A株同志およびB株同志の交差部分は全く溶菌しなかった。これらの結果はファージを供与するのがB株であり、受取るのがA株であることを示した (b) の結果を裏づけるものであり、またB株の免疫性を示した (c) の結果をも同時に裏づけるものであった。

(e) ファージの誘導試験

i) マイトマイシンCによる場合 : ブイヨン培地に1夜振盪培養した *Microbact. ammoniaphilum*-B をさらにブイヨン培地で 10 倍に希釈して 30° で 3 時間振盪培養する。その 0.5 ml とマイトマイシンC 0.5 ml (終濃度が 0.05~0.5% となるように) とをS培地 4 ml 宛分注した試験管に加えて 30° で振盪培養し、その後一定時間にその一部を採取して直ちに指示菌にA株を用いて寒天重層法により全溶菌斑数を

(*Microbact. ammoniaphilum*-A) (*Microbact. ammoniaphilum*-B)

第1図 追加感染に対する免疫性

Microbacterium ammoniaphilum-B の単コロニーとA株の混合培養液 (クロロホルム処理) をスポットした。

第2図 Cross brushing culture

A : *Microbact. ammoniaphilum*-A

B : " " -B

M : AとBの混合培養液 (クロロホルム処理)

P-1 : ファージ P-1

第3図 マイトマイシンCによるファージの誘導

使用菌株: *Microbacterium ammoniaphilum*-B
30°, 振盪培養S培地

—●— 対 照 —○— マイトマイシン 0.05%
 —×— " 0.1
 —△— " 0.5

* Infective center

(Infective center) を定量した。第3図に示したように、マイトマイシンCとの接触 20 秒後から急にファージ数の増加がみられ、60 秒後に最高に達し、以後一定となった。マイトマイシンCの各濃度でこの傾向は一致していた。マイトマイシンC無添加の場合はほとんどファージ数の増加がみられないことから、マイトマイシンCの添加によりB株からファージの誘導が活発に行なわれ、ファージを放出する細胞の数が増大したものと推定した。なお、Otsuji ら⁽¹⁰⁾は溶原菌 *E. coli* K-12 からマイトマイシンCでファージの誘導を行ない、マイトマイシンC 0.05%の添加により多量のファージが誘導されたと報告している。

ii) 紫外線照射による場合: i) と同じ方法で培養した *Microbacterium ammoniaphilum*-B を遠心集菌して生理食塩水に懸濁 (5×10^8 こ/ml) し、その 5 ml を直径 9 cm のシャーレに入れ、ナショナル紫外灯 GL-15 の直下 30 cm に置いて一定時間照射を行なった。実験は暗所で行ない、照射後その 2.5 ml に等量のブイヨン培地を加え、指示菌にA株を用いて寒天重層法によりファージ数(全溶菌斑数 Infective center)を測定した。第4図に示したように、照射 8~12 秒で放出されるファージ(全溶菌斑)数は最高に達した。特に 40 秒の照射では当初のファージ数以下に減少した。照射をしない場合のフ

第4図 紫外線によるファージの誘導

使用菌株: *Microbacterium ammoniaphilum*-B
(5×10^8 こ/ml)生理食塩水に懸濁, UV-15W ナショナル殺菌灯下 30 cm 照射
—×— 対 照 —○— UV 照射

ファージ数の変化はほとんど無視されるから、i) の結果と同様に紫外線照射によってB株からファージが誘導されたことは明らかであった。Lwoff⁽¹¹⁾らは *B. megaterium* 899 のファージが紫外線照射で誘導されたことを、Weigale ら⁽¹²⁾も *E. coli* K-12, *P. pyocyanea* のファージが紫外線で非常に効果的に誘導されたことを、Groman ら⁽¹³⁾は *C. diphtheria* C₄ の紫外線照射で γ および β ファージが菌数の 10~15% に当るだけ誘導されたことを、また Field ら⁽¹⁴⁾は *M. lysodeikticus* ML 53-40 を紫外線照射して N 5 ファージを誘導したことを報告している。溶原性の確認のためには尾辻氏⁽²⁾によると (a) と (c) の条件を具備する必要があるとしているが、著者らの結果は、それらの条件も含めて溶原性の確認試験は全て *Microbact. ammoniaphilum*-B が溶原株であることを肯定した。従って著者らはB株を溶原株と判定した。

要 約

L-グルタミン酸生産菌 *Microbact. ammoniaphilum*-A のファージ耐性菌株について発酵試験を行ない、各耐性菌株ともに原株に劣らぬ発酵能を有することが判明した。また *Microbact. ammoniaphilum*-B の溶原性を確認するために、単コロニーの継代培養、AとB株との混合培養、追加感染、cross brushing method、誘導等の方法により検討した結果、B株の溶原性は明らかになった。

終りに臨み、本研究に当り終始御指導くださいました群馬大学医学部細菌学教室三橋進教授に深く感謝いたします。なお、本研究の発表を許可くださいました当社食

品事業部宮井恭一次長, 川野義男参事に謝意を表します。

本研究は農芸化学西日本支部例会 (昭和 39 年 4 月, 久留米) にて発表した。

- (1) S. E. Luria : *Genetics.*, **28**, 491 (1943).
- (2) 尾辻 望 : 蛋・核・酵, **6**, 588 (1961).
- (3) 阮 豊山 : 化学, 中華民國 50 年第 2 期, p. 88 (1961).
- (4) 北原覚雄, 金子太吉 : 本誌, **32**, 411 (1958).
- (5) 木下祝郎, 寺本賢一郎 : 本誌, **29**, 487 (1955).
- (6) 瀬戸 進, 大沢岳義, 山本外男 : 本誌, **38**, 41 (1964).
- (7) E. Gildmeister, K. Herzberg : *Zntr. Bakt.*

- Parasitenk. 1 Abt., Orig.* **93**, 402 (1924).
- (8) J. Bordet : *Ann. Inst. Pasteur.*, **39**, 711 (1925).
- (9) P. B. Cowles : *J. Bacteriol.*, **22**, 119 (1931).
- (10) N. Otsuji, M. Sekiguchi, T. Iijima, Y. Takagi : *Nature.*, **184**, 1079 (1959).
- (11) A. Lwoff, L. Simonovitch, N. Kjeldgaard : *Ann. Inst. Pasteur.*, **62**, 301 (1951).
- (12) J. J. Weigle, M. Delbrück : *J. Bact.*, **62**, 301 (1951).
- (13) N. B. Groman, M. Eaton, Z. K. Booker : *ibid.*, **75**, 320 (1958).
- (14) A. K. Field, H. B. Naylor : *ibid.*, **84**, 1129 (1962).