マイトマイシン C の *Lactobacillus casei*- J1 ファージ系に対する影響

村田 晃, 辻 正信*, 添田栄一, 猿野琳次郎, 桜井稔三**
(佐賀大学農学部発酵生産学研究室, **ヤクルト研究所微生物部)

昭和 46 年 7 月 19 日 受 理

Effect of Mitomycin C on *Lactobacillus casei*-Phage J1 System

By Akira MURATA, Masanobu TSUJI,* Eiichi SOEDA,
Rinjiro SARUNO and Toshizo SAKURAI**

Laboratory of Applied Microbiology, Department of Agricultural
Chemistry, Saga University, Saga 840; **Yakult Institute for
Microbiological Research, Kunitachi, Tokyo 186, Japan

The inhibition of intracellular growth of phage J1 by mitomycin C (40 $\mu\text{g/ml}$) was described. Mitomycin C failed to affect the infectivity of free phage, the adsorption of phage and the injection of phage DNA. But, the injected DNA irreversibly lost its infectivity. Mitomycin C inhibited the formation of phage DNA, of phage protein having serum-blocking power and of phage endolysin. Pulse treatment with mitomycin C and radiobiological analysis showed that an early stage of phage growth was blocked.

Consequently, a primary and major action of mitomycin C on phage growth seems to be the formation of cross-links in the injected parental phage DNA which prevents the replication of phage DNA.

When exposed to mitomycin C (0.3~1 $\mu\text{g/ml}$), *L. casei* S-1 continued to grow for about 350 min and then began to lyse. Electron microscopic observation showed the presence of phage particles in the lysate and the infectivity of the particle was also proved. These results show that *L. casei* S-1 is lysogenic and phage development in the lysogenic strain is induced by mitomycin C.

(Received July 19, 1971)

* Present address: Taito Pfizer Co., Ltd.

緒 言

発酵におけるファージ防除対策としてのファージ増殖抑制に関しては、有効因子の at random な検索に並行して、目的とする発酵に関係するファージの基礎研究、とくにファージの増殖機構についての研究を進めていく必要がある。ファージの増殖機構が、その制御機構をも含めて究明されるにつれ、理論的根拠に基づいてのファージ増殖抑制の可能性が生じることが期待される。

乳酸菌利用発酵に使用されている *Lactobacillus casei* の J1 ファージの増殖機構を究明する一手段として、生

* 現在、台糖ファイザー株式会社。

体高分子物質の生合成に影響を与える抗生物質を阻害剤として用い、それら阻害剤のファージ増殖阻害の機作について検討し、正常なファージ増殖過程の解析を行なうとした。抗生物質としては、DNA の生合成を阻害するマイトマイシン C^(1,2)、DNA 依存 RNA の生合成を阻害するアクチノマイシン D⁽³⁻⁵⁾、タンパク質の生合成を阻害するクロラムフェニコール^(6,7) などを用いた。

なお、阻害剤として抗生物質を用いた理由の一つは、他の発酵の例で抗生物質の使用が、ファージの防除対策に有効である場合があると報告されている⁽⁸⁾ので、*L. casei* 使用の乳酸菌利用発酵においても、抗生物質の影響を検討する要があると考えられたためである。実際

に, *L. casei* のストレプトマイシン耐性変異菌株の中に, 抗生物質耐性と同時に, J1 ファージ抵抗性を示すものが存在することは既報⁽⁹⁾した。

本報文では, *L. casei*-J1 ファージ系に対する抗生物質の影響に関する研究の第 1 報として, マイトマイシン C について報告する。

実験材料および方法

1. 宿主菌-ファージ系 *L. casei* S-1 と J1 ファージの系⁽¹⁰⁾を使用した。一部の実験においては, S-1 から誘導したストレプトマイシン耐性菌株⁽⁹⁾および J1 ファージ抵抗性菌株 (S-1/J1), さらに J1 から誘導した宿主域変異株 (J1h) ファージも使用した。

2. 培地および希釈液 菌の培養および諸実験は, 特記しない限り, MRT 培地 (pH 6.0) を使用して行なった。菌およびファージの希釈には, リン酸バッファー (pH 7.0) を主体にした希釈液を使用した。組成は, いずれも既報^(11,12)。

3. 抗生物質 マイトマイシン C は, 協和醸酵工業 (株) の製品を使用した。

4. 菌の培養方法および濁度の測定 1 白金線量の穿刺培養保存菌体を液体培地 (10ml) にとり, 約 15 時間静置培養 (以下の培養・諸実験もすべて静置), さらに新しい液体培地に 5 vol % 接種し, 約 4 時間培養して培養液の吸収度が 0.6 に達したものを, 対数増殖期の菌細胞として使用した。一部の実験においては, 2 vol % 接種し, 約 3 時間培養した対数増殖期初期の菌細胞を使用した。培養温度は 37°C (以下の培養・諸実験においても, 特記しない限り温度は 37°C)。タービド・エル・セル (藤本理化学器械製作所) 中の培養液の吸収度は, 光電比色計 (島津-Baush-Lomb, スペクトロニック 20, 波長 620 m μ) を使用して, 直接測定した。ブランクは未接種の培地。

5. 電子顕微鏡技術 溶菌液遠心上澄にポリエチレン glycol (final 10%) を加えて, ファージを沈殿させた。ついで, 遠心分離してファージを集め, トリスバッファー (0.5 M, pH 7.2) に懸濁 (100 倍濃縮), 同バッファーに対して透析した。精製は CsCl 密度勾配遠心分離法 (日立 55 P-2 型超遠心機使用) により行ない, 採取したファージ分画は, 酢酸アンモニウム溶液に対して透析した。リンタングステン酸でネガティブ染色したものを試料とし, 電子顕微鏡 (日本電子 JEM-7 A 型使

用) を用いて観察した。

6. ファージ感受性菌の検索 既報⁽¹³⁾に同じスポットテスト法で, 1 次検索を行なった。検索に使用した *Lactobacillus* 属各種菌株は, いずれもヤクルト研究所の保存菌株である。この中には, M. E. Sharpe 博士 (英国国立酪農研究所) および光岡知足博士 (理化学研究所) に由来する株を含む。菌株の分類基準は, Sharpe の血清学的分類^(14,15)によったものである。菌株の詳細については, 既報^(13,16)を参照されたい。 *L. salivarius*, *L. bulgaricus* および *L. brevis* の一部の菌株は, MRT 培地の代りに MRS 培地⁽¹⁷⁾を使用した。また, S-1 以外の *L. casei* の各株は, 37°C の代りに 30°C で培養した。

7. 生菌数の計数およびファージの定量 生菌数の計数はコロニー・カウント法⁽⁹⁾, ファージの定量は重層法によるブラック・カウント法⁽¹¹⁾によった。細胞内ファージの定量は, ストレプトマイシンを使用して, 早期溶菌を起こさせる方法⁽⁹⁾によった。

8. ファージの吸着 菌液 (2×10^8 cells/ml) にファージを m. o. i. 約 1 になるように加え, 3 分間吸着させた。(1) 氷冷した希釈液で 100 倍希釈し, 遠心分離, 上澄の未吸着ファージを定量し, ファージの吸着率を測定した。(2) 希釈液で 100 倍希釈, ついで血清処理を行ない, 未吸着ファージを中和。指示菌を加えてプレートし, 感染菌を測定, 一方指示菌を加えず血清存在下にプレートし, 非感染菌を測定した。(3) 希釈せずに遠心分離を行ない, 沈降した感染菌を希釈液に再懸濁。ワーリングプレンドーで最高回転 2.5 分間処理後遠心分離し, 吸着後 DNA を注入せずに, 遊離するファージを定量した。

9. ファージの 1 段階増殖実験 既報⁽⁹⁾に同じ。

10. Serum-blocking power の定量 抗ファージ血清の調製は既報⁽⁹⁾。感染菌細胞の溶菌は, ストレプトマイシンを添加して行ない, 溶菌液中の serum-blocking power の定量は DeMars らの方法⁽¹⁸⁾に準じて行なった。すなわち, 薄めた血清 (final 1 : 20,000, $K=0.02$ m $^{-1}$) に溶菌液を加え, 18 時間培養。テストファージ (J1h 使用) を加え, さらに 4 時間培養し, 残存テストファージを S-1/J1 を指示菌として定量した。

11. 核酸およびタンパク質の定量 培養液の一定量を取り, Schneider の方法⁽¹⁹⁾に準じて核酸とタンパク質の両区分に分画, 各区分の DNA はジフェニルアミン法⁽²⁰⁾, RNA はオルシノール法⁽²¹⁾, タンパク質は銅-フ

オリソ法⁽²²⁾で定量した。細胞内ファージ DNA の定量は、不完全殺菌線量の紫外線を照射して、菌 DNA 合成を停止させた宿主菌にファージを感染させ、合成される DNA を定量する方法によった。詳細については、別に報告する⁽²³⁾。

12. 細胞内増殖型ファージの紫外線感受性 Luria, Latarjet の原報⁽²⁴⁾に準じた方法で検した。すなわち、菌液 (3×10^8 cells/ml) に、ファージを m. o. i. 約 0.01 になるように加え 1 分間吸着、ついで 1 分間血清処理 (99% の未吸着ファージを中和) した後、培地で適当に希釈し培養した。所定の時間に一部をとり、氷冷した希釈液で 10 倍希釈、紫外線を照射して線量に応じた残存プラーク形成能を調べた。紫外線照射源としては、殺菌灯 (東芝 GR-1512, 15 W) を使用。試料はペトリ皿 (直径 90 mm) に 5 ml とり、400 mm の距離から照射した。

実 験 結 果

1. マイトマイシン C の菌生育への影響

対数増殖期にある *L. casei* にマイトマイシン C を用わせて、菌の生育増殖に及ぼす影響を検した。まず、Fig. 1 に示すように、マイトマイシン C はこの菌に対して、殺菌的に作用することが認められた。99% 殺菌に要する時間は、 $2 \mu\text{g/ml}$ で約 30 分、 $10 \mu\text{g/ml}$ では約 10 分である。

ついで、Fig. 2 に菌の生育曲線に及ぼすマイトマイシン C の影響を示す。マイトマイシンの濃度に関係なく、培養 150 分までは対照とほとんど同じように、濁度は上昇した。150 分以後、 $0.01 \mu\text{g/ml}$ あたりから生育阻害の影響が現われ始め、 $2 \mu\text{g/ml}$ では完全に阻害されることが認められた。しかし、 $2 \mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度でも若干の濁度の上昇が続き、完全には停止しない。 $3 \mu\text{g/ml}$ のマイトマイシン C 含有培養液から経時的に試料をとり、光学顕微鏡の観察を行なったところ、細胞分裂はみられないが、細胞の生長は続いており、終局的には対照の 3~4 倍の長さに達することが観察され、濁度の上昇は説明された。

特異的なことは、 $0.3 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ の比較的低濃度の場合、マイトマイシン C 添加約 350 分後、それまで上昇を続けた濁度の減少 (溶菌) がみられることである。この溶菌誘起現象は、対数増殖期初期の菌細胞 (10^8 cells/ml 以下) をマイトマイシン C 処理したときに顕著に観

Fig. 1. Killing Rate of Bacteria after Exposure to Mitomycin C.

Bacteria (3×10^7 cells/ml) were exposed to mitomycin C in MRT broth (pH 6.0) at 37°C . Conc. of mitomycin C (final $\mu\text{g/ml}$) was indicated in the Fig.

Fig. 2. Effect of Mitomycin C on Growth Rate of Bacteria.

$5 \sim 7 \times 10^7$ cells/ml of initial bacteria. Conc. of mitomycin C (final $\mu\text{g/ml}$) was indicated in the Fig. and mitomycin C was presented throughout.

察されるが、対数増殖期後期の細胞を使用するときや、細胞数の多い培養 (10^8 cells/ml 以上) を処理したときには観察されない。

2. マイトマイシン C 誘起溶菌液中のファージ粒子

上述のマイトマイシン C 処理により誘起された溶菌液について、電子顕微鏡の観察を行なった。その結果、Fig. 3 に示すように、形態的には完全と考えられるファージ粒子の存在が認められた。このファージ粒子は、J1 ファージ⁽¹⁶⁾と類似した構造をもっており、正二十面体と考えられる頭部と、無鞘で横縞の存する尾部を有している。尾部末端には分岐した構造が認められるが、あま

Fig. 3. Electron Micrograph of Phage Particles Induced by Action of Mitomycin C from *L. casei* S-1.

The specimen was negatively stained using phosphotungstic acid and examined with a Nihon Denshi JEM-7 A electron microscope.

り顕著ではない。計測の結果、頭部直径は $30 \sim 40 \mu$ 、尾部の長さは $140 \sim 150 \mu$ であった。すなわち、J1 ファージに比して頭部はやや小型であり、尾部の長さは約半分である。

このファージ粒子が、感染活性を有しているか否かについて調べるために、*Lactobacillus* 属に属する諸菌種菌株を被験菌とするスポットテスト法を実施した。被験菌としては、*L. acidophilus* 2 株、*L. brevis* 4 株、*L. bulgaricus* 2 株、*L. casei* B 型菌 5 株、*L. casei* C 型菌 26 株、*L. fermenti* 2 株、*L. plantarum* 20 株、*L. salivarius* 3 株を使用した。

その結果、*L. casei* C 型菌に属する R 094 (=C 5, Sharpe 分与株) および L-864 (=II-1, 光岡分与株) の 2 株で、スポット斑の形成がみられた。さらに、R 094 株については、プラークも生じることが確認されたが、そのプラークはきわめて薄く、正確な計数は困難である。現在、計数の実用化を目指して、プラーク形成の条件などについて検討している。L-864 株では、R 094 株より溶菌程度の低いスポット斑が形成されるが、プラークは確認されていない。なお、S-1 菌株から cured cell を分離することにより、このファージの感受性菌を得る

ことができると考えられる⁽²⁵⁾ ので、マイトマイシン C 処理残生菌から cured cell を分離することを試みているが、現在までのところ成功していない。

いずれにしても、少なくとも 1 株のプラーク形成菌が見い出されて、このファージ粒子の感染活性は証明された。

3. マイトマイシンCの菌生体高分子生合成への影響

Table I に示すように、 $20 \mu\text{g/ml}$ のマイトマイシン C は、*L. casei* の DNA 生合成を完全に阻害するが、RNA、タンパク質の生合成に対しては、ある程度の影響しか与えないことが確認された。 $40 \mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度では、細胞内 DNA 量の減少が認められる。

4. マイトマイシンCの遊離ファージへの影響

Table II に示すように、マイトマイシン C は遊離状態の J1 ファージに対しては、影響を与えないことが認められた。

5. マイトマイシンCのファージ吸着への影響

Table III に、J1 ファージの吸着に及ぼすマイトマイシン C の影響を示す。マイトマイシン C は、ファージの菌細胞表面への吸着に対しては影響を与えないことが、未吸着ファージを測定する実験から明らかである。

Table I. Effect of Mitomycin C on Macromolecular Synthesis in Bacterial Cells

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Time incubated (min)	Relative amount		
		DNA	RNA	Protein
0	0	1.00	1.00	1.00
0	70	1.70	1.80	1.80
10	70	1.15	1.55	1.65
20	70	1.00	1.45	1.50
40	70	0.90	1.40	1.45

Bacteria (3×10^8 cells/ml) were incubated in MRT broth with or without mitomycin C. Cells were fractionated to isolate the nucleic acids and protein components by the method of Schneider. DNA, RNA and protein were estimated by the diphenylamine method, the orcinol method and the Folin phenol reagent method, respectively.

Table II. Effect of Mitomycin C on Free Phage Particle

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Survival (%)
0	100
10	100
40	98

Initial phage 2×10^7 PFU/ml, in broth, pH 6.0, at 37°C . Survival of the control (0 μg) after 240 min-incubation was represented as 100%.

吸着後 DNA を注入せずに、ブレンダー処理によって遊離してくるファージの数は、対照に比べるとマイトマイシン C 存在下で有意義に多いといえるが、全体からみると 1~2% 以内での話であり、無視され得る。さらに、感染菌を測定する実験、あるいは後述の諸実験の結果をも考え合わせると、マイトマイシン C は吸着に引き続いた DNA 注入にも、ほとんど影響を与えないと考えられる。Table で問題になるマイトマイシン C 存在下でのファージ吸着菌の感染中心非形成（たとえば、40 $\mu\text{g/ml}$ で約 10% みられる）は、後述の諸実験から、注入された DNA に対してのマイトマイシン C の不可逆的作用の結果による感染中心非形成と説明できる。

6. マイトマイシン C のファージ増殖への影響

J1 ファージの 1 段階増殖に及ぼすマイトマイシン C の影響を Fig. 4 に示す。0.2 $\mu\text{g/ml}$ あたりからバーストサイズが減少し始め、20 $\mu\text{g/ml}$ では完全にバーストを抑えるが、潜伏期の長さには影響しないことが認められた。特徴的なことは、潜伏期間中に感染菌の感染中心

Table III. Effect of Mitomycin C on Adsorption

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Unadsorbed Phage ¹⁾ (%)	Released phage after blender treatment ²⁾ (%)	Infected bacteria ³⁾ (%)	Uninfected bacteria ³⁾ (%)
0	3.9	0.8	63	36
20	3.8	1.6	59	—*
40	3.7	1.9	56	—*

Bacteria (2×10^8 cells/ml) were infected with phage (m. o. i., ca. 1) in broth with or without mitomycin C and allowed to adsorb phage for 3 min.

¹⁾ Unadsorbed phage was measured by a 100-fold dilution of the sample, followed by elimination of cells by centrifugation. Input of phage was represented as 100%.

²⁾ Release of phage adsorbed was accomplished by blending for 2.5 min in a Waring blender. A sample was removed for centrifugation to assay released phage by the blender treatment. Infected cells in unblended sample was represented as 100%.

³⁾ Infected cells were determined by diluting the sample into antiphage serum, followed by plating the treated sample on agar seeded indicator cells. Uninfected cells was measured by plating sample on agar containing antiphage serum. Input of bacteria was represented as 100%.

* Unable to measure because of killing action with mitomycin C.

Fig. 4. Effect of Mitomycin C on One-step Growth of Phage.

Bacteria (2×10^8 cells/ml) were infected with phage (m. o. i., ca. 0.1). after 3 min of adsorption and 3 min of an antiserum treatment, the infected cells were diluted 1:2000 into broth and incubated. Mitomycin C was added at the infection time. Conc. of mitomycin C (final $\mu\text{g/ml}$) was indicated in the Fig.

形成能喪失がみられることである。これは、バーストを完全に抑えない低濃度においてもみられるが、とくに $10 \mu\text{g/ml}$ 以上で顕著である。この感染中心の喪失は、感染菌細胞の早期溶菌によるものではない (Fig. 5 参照)。

7. マイトマイシンCによるファージ増殖阻害の機作

マイトマイシンCによる J1 ファージの増殖阻害は、ファージ DNA の注入以後の増殖段階であることは、前述までの結果から明白である。本項では、マイトマイシンCによる菌細胞内ファージ増殖阻害の機作を究明するために行なった諸実験について記述する。マイトマイシンCは、特記しない限り $40 \mu\text{g/ml}$ 濃度を使用し、かつファージ感染直前に添加し、全実験時間にわたり存在させたものである。

a. ファージ感染菌細胞の溶菌: Fig. 5 に示すように、マイトマイシンC存在下では、ファージ感染菌細胞の溶菌は生起しないことが認められた。

Fig. 5. Effect of Mitomycin C on Lysis of Phage-infected Cells.

2×10^8 cells/ml of initial bacteria, m.o.i., ca. 20. Mitomycin C was added at the infection time. Conc. of mitomycin C (final $\mu\text{g/ml}$) was indicated in the Fig.

b. 成熟ファージ粒子の形成: 経時的に感染菌細胞の一部をとり、ストレプトマイシン誘起早期溶菌法⁽⁹⁾により細胞内ファージの定量を行なったが、細胞内ファージは全く検出されなかった。すなわち、マイトマイシンC存在下では、成熟ファージ粒子は形成されないことが認められた。このことは、成熟段階以前の暗黒期 (感染後約 40 分まで) の増殖段階が、マイトマイシンCによって阻害されていることを示す。

c. ファージタンパク質の合成: Table IV に示すように、マイトマイシンC存在下では、serum-blocking

Table IV. Effect of Mitomycin C on Serum-blocking Power Formation

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Serum-blocking power (%)
0	100
2	50
5	15
10	5
20	0

The infected cells were lysed with streptomycin 120 min after infection, and serum-blocking power in the lysate was determined. Survival of test phage in the control tube ($0 \mu\text{g}$) was represented as 100%, and that in serum control tube as 0%.

Table V. Effect of Mitomycin C on Phage DNA Synthesis

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Time incubated (min)	Relative amount of phage DNA (%)
0	0	0
0	70	100
10	70	40
20	70	25
30	70	10
40	70	0

Exponentially growing bacteria (3×10^8 cells/ml) were irradiated with UV lamp to stop cellular DNA synthesis. After 10 min-preincubation the irradiated cells were infected with phage (m.o.i., ca. 20) and incubated. Mitomycin C was added prior to infection.

power を有するファージタンパク質の生成は認められなかった。

d. ファージ DNA の合成: Table V に示すように、マイトマイシンC存在下では、ファージ DNA の合成は認められなかった。宿主菌の DNA 合成が完全に阻害される $20 \mu\text{g/ml}$ (Table I 参照) で、若干量ではあるがファージ DNA の合成がみられる。これはファージ DNA 合成系の方が、菌 DNA 合成系よりも多少マイトマイシンCに耐性であることを示す。

e. 放射線生物学的解析: 細胞内における増殖型ファージの紫外線感受性を指標として、感染活性のあるファージ DNA の複製に対するマイトマイシンCの影響について検討した。結果は Fig. 6 に示す。曲線の最初の plateau は、細胞当りの紫外線感受性 target (ファージ DNA と考えてよい) の数を示し、曲線の最終的傾斜は個々の target の紫外線感受性を示すが、詳細な説明に

Fig. 6. Effect of Mitomycin C on UV Sensitivity of Vegetative Phage during Intracellular Growth.

Bacteria (3×10^8 cells/ml) were infected with phage (m.o.i., ca. 0.01). After 1 min of adsorption and 1 min of an antiserum treatment, the infected cells were diluted into broth and incubated. At the time, as indicated in the Fig., phage growth was halted by diluting 10-fold into chilled 0.01M phosphate buffer (pH 7.0). A 5 ml chilled sample was irradiated with UV light (15 W germicidal lamp) in a open petri dish (90 mm in diameter) placed at a distance of 400 mm from a lamp.

については既報⁽¹²⁾を参照されたい。

対照と比較して明らかなように、マイトマイシン C 存在下では、ファージ DNA の複製は起こっていないことが示され、上述の DNA の量的増加がないという結果と一致する。

f. 潜伏期中マイトマイシン C 除去実験：時間的に感染何分後の（何分後から始まる）ファージ増殖段階が、マイトマイシン C に感受性であるかを知るために、以下の実験を行なった。マイトマイシン C 存在下に感染させて、潜伏期の途中でマイトマイシン C を除去（400 倍希釈して影響のない濃度にまで薄める）、さらに培養を続けた場合、対照に比べて何分の遅れをもって、細胞内に成熟ファージが出現するかを調べた。結果は Fig. 7 に示す。マイトマイシン C 非存在下に感染培養した対照に対する遅れ時間は、感染 10 分に除去したとき 7 分、20 分のとき 16 分、30 分のとき 25 分であった。このことは、薬剤除去後 lag なしに反応が再開されるものとすれば、感染 3～5 分（最小潜伏期 約 80 分）の増殖段階が、マイトマイシン C によって阻害されることを示す。薬剤処理時間の長さに応じて、若干分の lag があるとすれば、感染 3～5 分の段階より前の段階ということ

となる。いずれにしても、DNA 注入に引き続き初期の増殖段階が、マイトマイシン C によって阻害されることは明白である。

さらに Fig. から次のことも合わせ示される。除去時間が遅い（マイトマイシン C 処理時間が長い）ほど、全ファージ数は減少するが、これは時間の経過につれ感染中心形成細胞数が減少するためと、細胞当りのバーストサイズが減少するためとである。感染中心を形成しなくなった細胞では、マイトマイシン C を除去しても阻害の回復はみられない。すなわち、マイトマイシン C による阻害は、時間の経過とともに不可逆的になる。

g. 潜伏期中マイトマイシン C 添加実験：マイトマイシン C 非存在下に感染させて、潜伏期の途中でマイトマイシン C を添加、さらに培養を続けた場合の成熟ファージ出現の様相を調べた。結果は Fig. 8 に示す。感染 20 分以内に添加したときは、成熟ファージの形成はみられなかった。20 分以後に添加したときは、成熟ファージの出現がみられ

Fig. 7. Intracellular Phage Growth after Removal of Mitomycin C.

Bacteria were infected with phage under the presence of mitomycin C (40 µg/ml). At the time, as indicated in the Fig., the infected cells were diluted 400-fold into mitomycin C-free broth and further incubated. Time courses of intracellular phage growth were measured after premature lysis with streptomycin. Number of initial infected cells was represented as 1.

—○— infected cells which form infective center.

Fig. 8. Intracellular Phage Growth after Delayed Addition of Mitomycin C.

At the time, as indicated in the Fig., mitomycin C (final 40 µg/ml) was added to the infected cell culture and the culture was further incubated. Other experimental details were the same as described in Fig. 7.

るが、その数は一度増加した後に減少することが認められた。最終の全ファージ数は、添加時間が早いほど少ない。いずれにしても、マイトマイシンCのファージ増殖阻害効果は、暗黒期の前半期に添加したときに強く現われるので、初期の増殖段階がマイトマイシンCによって阻害されるという、上述の実験結果を裏づけする。さらにマイトマイシンCは、潜伏期のほとんど全期間にわたって影響を与えているので、マイトマイシンCによって阻害される初期の増殖段階というのは、暗黒期の前半期に始まり、潜伏期のほとんど全期間にわたって継続する過程であることを示す。

考 察

L. casei S-1 菌株に対するマイトマイシンCの作用について、総括し考察すると次のようになる。殺菌的に作用し、細胞分裂を阻害する。細胞のDNA合成を阻害するが、DNAやタンパク質の合成に対しては、さほど影響を与えない。したがって、細胞のunbalanced growth⁽²⁶⁾は続くので、細胞が伸長する。高濃度では、細胞のDNAを崩壊させる。これらのことは*Escherichia coli*などの細菌について知られているマイトマイシンCの作用^(1,2,27)と、*L. casei*に対する作用とに、本質的な相違はないことを示すものである。

マイトマイシンCの*L. casei* S-1 菌株に対する特異的な作用として、比較的低濃度の薬剤処理を行なうと、一定時間培養後に溶菌を誘起することが見出された。この遺伝子を追究した実験から、J1あるいはその類縁ファージの宿主菌株として広く使用されているS-1菌株が、溶原菌であることが明らかになった。溶菌誘起は、S-1菌株の保有するプロファージが誘発性であり、強力な誘発剤であるマイトマイシンC⁽²⁸⁾処理によって、ファージの増殖が誘発された結果にほかならない。

Lactobacillus 属の溶原性について、系統的に研究を進めている桜井らは、*Lactobacillus* 属には溶原菌はほとんど存在しないという従来の知見^(29,30)をくつがえして、*L. salivarius* や *L. casei* C 型菌には、マイトマイシンC誘発性のプロファージを保有する菌株が、多数存在することを報告している^(13,25,31)。S-1菌株の属する*L. casei* B 型菌についても、本研究と相前後して桜井らにより、マイトマイシンC誘発性のプロファージを保有する溶原菌株の存在(被験6株中3株)が確認されている⁽³²⁾。S-1菌株も含めて、*L. casei* B 型菌の溶原性についての詳細は、別に報告する予定であるので、本報ではこれ以上ふれない。

マイトマイシンCは、遊離状態のJ1ファージ粒子に対しては不活性化作用を有しないが、J1ファージの増殖に対しては阻害作用を示す。J1ファージ増殖阻害の作用機作を明らかにするために行なった諸実験の結果を総括し考察すると、次のようになる。マイトマイシンCは、ファージの菌細胞表面への吸着、ファージDNAの菌細胞内注入は阻害しない。一方、マイトマイシンC存在下で成熟ファージの形成はみられない。したがって、DNA注入以後、成熟ファージ形成以前の暗黒期におけるファージ増殖のいずれかの段階が、マイトマイシンCによって阻害されることがまず示される。マイトマイシンC存在下で、ファージDNAの複製が起らないことは、ファージDNAの化学的定量実験、および放射線生物学的研究から明示される。他方、serum-blocking powerを有するファージタンパク質の生成がみられないことが血清学的に、さらにファージエンドリジンの生成もみられないことが、感染菌細胞の溶菌生起を調べて間接的に示されている。放射線生物学的研究、およびマイトマイシンC・パルス実験から、暗黒期初期の増殖段階が、マイトマイシンCによって阻害されることが示されている。さらに、潜伏期中途からのマイトマイシン

C・パルス実験の結果は、マイトマイシンCによって阻害されるのは、暗黒期の前半期に始まり、潜伏期のほとんど全期間にわたって継続するファージ増殖過程であることを示している。

一般に、マイトマイシンCのDNAに対する作用として、相補的DNA鎖の間にクロスリンクを形成することが知られており、DNAが複製を行なう際、1本鎖DNAへの開裂がその部分で阻止され、それによってDNA生合成が阻害されると理解されている^(38,94)。

以上総合して、マイトマイシンCのJ1ファージ増殖阻害の機作は、菌細胞内に注入された親ファージDNAが、マイトマイシンCの作用を被り、分子内にクロスリンクを形成することに基づくもので、このために子ファージDNA複製のプライマーとしての働きを喪失し、ファージDNAの複製がブロックされるためと考えられる。

潜伏期途中からのマイトマイシンC・パルス実験の結果は、一度複製を開始したDNA合成系に対しても、マイトマイシンCは作用し、semi-conservative複製の過程において、新たにプライマーとなるDNAの活性を喪失させ得ることを示す。さらに、成熟前の状態にある新生子ファージDNAに対しても作用し、そのDNAが感染性を喪失するようになることも合わせ示す。

マイトマイシンCが*E. coli*のT系ファージの増殖を阻害することは、関口・高木によって報告され、とくにT2ファージについては詳細に研究されている^(2,35,96)。T2ファージの場合、マイトマイシンC存在下でファージDNA合成系、ファージタンパク質合成系ともに阻害を受けず、溶菌も起こり、形態的には正常と変わらないファージ粒子が放出される。しかし、合成されたファージDNAは、生物活性がなく感染性が示されない。T2ファージのDNA合成で特徴的なことは、宿主菌のDNA合成が、完全に阻害されるマイトマイシンC濃度下で、ファージDNAの合成(量的に対照と同程度)が起こることであり、このことはT3、T5ファージでも同様である。しかし、その原因はまだ明らかにされていない。J1ファージ系においても、多少この傾向がみられることは前述している。

以上述べたように、マイトマイシンCのファージ増殖阻害の作用機作は、*E. coli*ファージと*L. casei*ファージとで、かなり相違する。相違は、*E. coli*ファージDNAの生合成系が、マイトマイシンCに耐性であり、

一方*L. casei*ファージのそれは、感受性が高いということに基づくものであろう。

要 約

*L. casei*のJ1ファージの増殖機構究明の一手段として、宿主菌のDNA合成を特異的に阻害するマイトマイシンCを阻害剤として用い、この阻害剤のファージ増殖阻害の機作について研究した。まず、マイトマイシンCが、J1ファージの増殖を阻害することを確認した。マイトマイシンCは、遊離ファージを不活性化せず、吸着、DNA注入も阻害しなかった。一方、マイトマイシンC存在下で、ファージDNAの複製、serum-blocking powerを有するファージタンパク質、ファージエンドリンの合成はみられなかった。放射線生物学的研究、およびマイトマイシンC・パルス実験は、初期の増殖段階がマイトマイシンCにより阻害されることを示した。

以上およびその他の実験結果、ならびにマイトマイシンCの一般知見とから、マイトマイシンCのJ1ファージ増殖阻害の機作は、菌細胞内に注入されたファージDNAが、マイトマイシンCの作用を被り、分子内にクロスリンクを形成することに基づくもので、このために子ファージDNA複製のプライマーとしての活性を喪失し、ファージDNAの複製がブロックされるためと考えられた。

なお、比較的低濃度のマイトマイシンCを*L. casei*S-1菌株に作用させると、処理一定時間後に溶菌が誘起されることが示された。電子顕微鏡観察は、溶菌液中にファージ粒子の存在することを示した。さらに、この粒子の感染性も、プラークを形成する感受性菌株を見出し証明した。これらの結果は、*L. casei*S-1菌株は溶菌菌であることを示し、また溶菌誘起はファージの増殖が、マイトマイシンCによって誘発されたためであることを示した。

終りにのぞみ、ご教示ご討議を頂いた久留米大学助教松本勇博士、ご助言ご鞭撻を賜った九州大学教授本江元吉博士ならびにヤクルト研究所所長代田稔博士に深謝します。なお、研究費の一部は九州乳酸菌研究会からの研究費によった。付記して謝意を表する。本研究の概要は昭和46年5月、日本農芸化学会西日本支部例会(於北九州市)で発表した。

(1) S. Shiba, A. Terawaki, T. Taguchi and J.

- Kawamata : *Nature*, **183**, 1056 (1959).
- (2) M. Sekiguchi and Y. Takagi : *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 434 (1960).
- (3) I. H. Goldberg and M. Rabinowitz : *Science*, **136**, 315 (1962).
- (4) J. Hurwitz, J. J. Furth, M. Malamy and M. Alexander : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **48**, 1222 (1962).
- (5) E. Reich : *Cancer Res.*, **232**, 1428 (1963).
- (6) E. F. Gale and J. P. Folkes : *Biochem. J.*, **53**, 493 (1953).
- (7) C. L. Wissemann, J. E. Smadel, F. E. Hahn and H. E. Hopps : *J. Bacteriol.*, **67**, 662 (1954).
- (8) 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, 1970, p. 1.
- (9) 村田 晃, 添田栄一, 猿野琳次郎 : 農化, **44**, 262 (1970).
- (10) 日野昌弘, 池辺信夫 : 農化, **39**, 472 (1965).
- (11) 村田 晃, 添田栄一, 猿野琳次郎 : 農化, **43**, 311 (1969).
- (12) A. Murata : *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 665 (1971).
- (13) 桜井稔三, 遠山 清, 新井 浩 : 日細菌誌, **26**, 473 (1971).
- (14) M. E. Sharpe : *J. Gen. Microbiol.*, **12**, 107 (1955).
- (15) M. E. Sharpe : *Dairy Sci. Abstr.*, **24**, 109 (1962).
- (16) 桜井稔三, 高橋徳太郎, 上山訓由, 新井 浩 : ウィルス, **19**, 311 (1969).
- (17) D. Man, M. Rogosa and M. E. Sharpe : *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130 (1960).
- (18) R. I. DeMars, S. E. Luria, H. Fisher and C. Levinthal : *Ann. inst. Pasteur*, **84**, 113 (1953).
- (19) W. C. Schneider : *J. Biol. Chem.*, **161**, 293 (1945); **164**, 747 (1946).
- (20) K. Burton : *Biochem. J.*, **62**, 315 (1956).
- (21) G. Ceriotti : *J. Biol. Chem.*, **214**, 59 (1955).
- (22) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : *ibid.*, **193**, 265 (1951).
- (23) 村田 晃 : 農化, **46**, 印刷中 (1972).
- (24) S. E. Luria and R. Latarjet : *J. Bacteriol.*, **53**, 149 (1947).
- (25) 遠山 清, 桜井稔三, 新井 浩 : 日細菌誌, **26**, 482 (1971).
- (26) S. S. Cohen and H. D. Barner : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **40**, 885 (1954).
- (27) E. Reich, A. J. Shatkin and E. L. Tatum : *Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 132 (1961).
- (28) N. Otsuji, M. Sekiguchi, T. Iijima and Y. Takagi : *Nature*, **184**, 1079 (1959).
- (29) J. N. Coetzee and H. C. De Klerk : *ibid.*, **194**, 505 (1962).
- (30) 村田 晃 : 醸協誌, **26**, 521 (1968).
- (31) T. Sakurai, T. Takahashi and H. Arai : *Japan. J. Microbiol.*, **14**, 333 (1970).
- (32) 桜井稔三, 植松昭雄 : 農化大会 (於東京) 講演要旨集, p. 76 (1971).
- (33) V. N. Iyer and W. Szybalski : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **50**, 355 (1963).
- (34) 松本 勇, 高木康敬 : 核酸 (高木康敬・三浦義彰編), 朝倉書店, 1970, p. 584.
- (35) M. Sekiguchi and Y. Takagi : *Nature*, **183**, 1134 (1959).
- (36) M. Sekiguchi and Y. Takagi : *Virology*, **10**, 160 (1960).