乳酸菌溶解酵素を産生する溶原株の熱誘発性 変異株の分離とその性質*

桜井稔三, 石和浩美
(ヤクルト本社研究所微生物部)

昭和 46 年 10 月 11 日 受 理

Isolation and Properties of Heat Inducible Mutants of Group C, *Lactobacillus*
(Studies on Lytic Enzymes Acting on Lactobacilli Part III)

By Toshizo SAKURAI and Hiromi ISHIWA

Yakult Institute for Microbiological Research Kunitachi, Tokyo, Japan

Treating a lysogenic strain of *Lactobacillus casei* IAM 1043 by nitrosoguanidine, 4 strains of heat inducible mutants of the temperate phage were isolated.

In the cells lysogenized with these mutant temperate phages, shifting the culture from 30°C to temperature over 36°C for a certain period of time resulted in conspicuous lysis at 150 minutes following the heat treatment. When the culture was shifted from 30°C to 40°C, maintenance of the cells at 40°C for 10 minutes was sufficient to induce the phage. The higher the temperature of the heat treatment is, the shorter the period required for the heat induction. The inducibility also depends on the age of the cells and the pH of the culture medium.

An attempt was made to induce the cells lysogenized with the mutant phages in a 100 litre tank.
(Received October 11, 1971)

緒 言

第 1 報⁽¹⁾および第 2 報⁽²⁾において、溶原株 IAM 1043 の誘発条件、およびファージ増殖に伴って放出される溶菌酵素の性質が検討された。この溶菌酵素は、作用域について既存の細胞壁溶解酵素と区別され、利用価値があるものと考えられる。

IAM 1043 は、マイトマイシン C (以下 MC と略記) または紫外線 (以下 UV と略記) の誘発に対して感受性が高く、容易に溶菌を起こすが、これらの手段はいずれも大量の菌の誘発に際しては用いにくい。この点から、大量の溶菌液を経済的に得るために、誘発の方法が検討される必要がある。この目的で、われわれは大腸菌ファージ λ⁽³⁻⁵⁾, *Salmonella typhimurium* ファージ P 22⁽⁶⁾,

および *Bacillus subtilis* 168⁽⁷⁾ 等で、すでに記載のある熱誘発性変異株の分離を試み、温度処理により簡単に誘発が起こり、酵素活性も原株と変わらない変異株の分離に成功した。本報告では、熱誘発変異株の分離方法、その誘発条件、および変異株を利用した大量誘発の試みについて述べる。

材 料 と 方 法

1. 菌株 IAM 1043, C-4304, IAM 1045 等は、第 1 報記載どおり、ht 1, ht 2, ht 3, ht 4 の各株は、後述の方法で IAM 1043 より分離した熱誘発性変異株である。

2. 培地 使用培地は、第 1 報⁽¹⁾どおり。

3. 熱処理 液体培養の場合は、サーモニクス KK 製、サーモボックス M-3 型を使用した。熱処理は、内

* 乳酸菌溶解酵素の研究 (第 3 報)。

径23mmの大型試験管に、30°Cで培養した $10^7 \sim 10^8$ /mlの生菌を含む菌液10mlを入れ、処理温度に移すとともに、はげしく振盪した。実測によれば、30°Cから高温に移した場合、液温が所定の温度に達するのに約90秒を要した。実験においては、処理時間に液温上昇の時間を補正した。熱処理後は30°Cにもどし、培養をつづけた。プレートでの熱処理は、処理温度に調整した孵卵器を使用した。この場合、プレートの温度上昇時間を考慮して処理時間は60~90分とした。

4. マイトマイシンCおよび紫外線処理 方法および条件は、いずれも第1報⁽¹⁾どおり。

5. 菌の濁度、溶菌液のファージ活性、酵素活性の測定法 第1報⁽¹⁾、第2報⁽²⁾どおり。

6. 大量培養法 関西化学機械製、100lのステンレス製培養装置を使用した。

Fig. 1. Decrease of the Viable Count by Nitrosoguanidine Treatment.

Nitrosoguanidine (final concentration, 400 μ g/ml) was added to the bacteria grown in the MRT medium and the culture was incubated at 30°C. Aliquots were withdrawn at various times for the measurement of the viable count.

結 果

1. 熱誘発性変異株の分離方法

IAM 1043 の対数増殖期の培養に最終濃度 400 μ g/ml の N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (以下 NTG と略記) を加え、30°C、60 分間処理した。NTG 処理による IAM 1043 の生残曲線を、Fig. 1 に示す。60 分間処理した菌を希釈し、MRS 平板に塗布し、コロニーを作らせた。30°C、48 時間培養後、生じたコロニーをレプリカし、マスタープレートを 43~45°C に 1 時間保った。高温処理後、酵素の基質となる IAM 1045 の培養を加えた軟寒天を重ねし、30°C、10~12 時間培養した。次に、クロロホルム蒸気で菌を殺し、37°C に移して、さらに 3~5 時間保存、コロニーの周囲に大きな溶菌輪の生じたものについて (Fig. 2)、レプリカプレートより菌を分離した。分離株について、さらに液体培養で熱処理による誘発の程度を調べ、良好なものを実験に使用した。NTG 60 分処理の場合、変異株の出現頻度は生残菌に対して約 0.1% であった。

このようにして分離した変異株の 1 株、ht 1 について

Fig. 2. Detection of the Mutants by Chloroform Vapor.

After nitrosoguanidine treatment (60, 30°C), the colonies formed by survival bacteria were heated at 43°C for one hour. Soft agar was laid on them with the indicator, then they were incubated overnight at 30°C.

After exposure to chloroform vapor, the colonies were incubated at 37°C for 3~5 hours. The left upper part of the picture shows the colonies of the mutant.

Fig. 3. Heat Induction of *L. casei* IAM 1043 and of Its Mutants, and the Enzyme Activity of the Lysate.

(I) The bacteria ($5 \times 10^7/\text{ml}$) grown in the MRT medium (30°C) were treated with heat for 10 minutes at 45°C and were restored to 30°C for continued cultivation. ○—○ IAM 1043 heat treat, ●—● IAM 1043 MC (0.4 µg/ml) treat, △—△ ht 1 heat treat.

(II) Enzyme activity of the lysate: The lysate was added to the dry cell of *L. casei* IAM 1045 and were incubated at 37°C for evaluation of changes in the turbidity.

○—○ cont. IAM 1045 Tris suspension, ●—● IAM 1043 MC, treat, lysate, △—△ ht 1 heat treat, lysate.

の熱誘発による濁度の変化, および溶菌液の酵素活性を Fig. 3 に示す。IAM 1043 を対照として用いた。44°C, 10 分間の処理後, 約 150 分後に顕著な濁度の減少が起きた。溶菌液の酵素活性は, IAM 1043 の MC 処理溶菌液のそれと有意の差は認められず, 酵素の作用域, 至適 pH, 熱不活化等の性質も, IAM 1043 原株からの酵素材料と同様であった。IAM 1043 原株は, 熱処理によつては, 全く誘発が起きなかった。

2. 熱誘発性変異株の UV による誘発

λ ファージの溶原株の熱誘発性変異株の場合, UV 感受性が野生株に比して, はるかに高いものがあることが報告されている⁽⁸⁾。この点について, われわれの分離した変異株での誘発の結果を Fig. 4 に示す。Fig. 5 は IAM 1043 原株 C-4304, および熱誘発性変異株の UV 照射後

Fig. 4. Induction of *L. casei* IAM 1043 and Its Mutants by Ultraviolet Rays.

After the bacteria suspended in Tris buffer (pH 7.4) were irradiated by ultraviolet rays at $4.5 \text{ erg/cm}^2/\text{sec}$ for 40 seconds, they were returned to the MRT medium for continued incubation (30°C).

○—○ IAM 1043, ●—● ht 1, ○—○ ht 2.

Fig. 5. Effect of Ultraviolet Rays on *L. casei* IAM 1043 and Its Mutants.

The bacteria were suspended in Tris buffer and were irradiated by $5.4 \text{ erg/cm}^2/\text{sec}$ of ultraviolet rays. Part of the material was sampled at different times for the measurement of the viable count.

△—△ C-4304, ●—● ht 2, ▲—▲ ht 1, ○—○ IAM 1043.

の生残率を示したものである。変異株は, UV による誘発は起こりにくい。

3. 熱誘発性変異株から放出されるファージによる C-4304の再溶原化

熱誘発変異株が、ファージの変異にもとづくものであることを確かめるため、C-4304を ht 1の誘発により放出されるファージで再溶原化する実験を行なった。この場合、 ht 1溶菌液中に少数の熱誘発性の原株が混入する可能性を除去するため、溶菌液をあらかじめミソポアフィルターで濾過した。

C-4304の培養を軟寒天法でプレートし、 ht 1溶菌液をスポットした。30°C, 48時間培養後、スポット内に生じたコロニーを採取して、熱処理(44°C, 10分間)を行なって誘発の有無をしらべた。一つのスポットから10株ずつ、全部で40株をテストした結果、37株が ht 1同様、熱処理により顕著な溶菌を示した。この結果から、熱感受性変異は、ファージの変異であることが確認された。

4. 変異株の誘発に関する諸条件

4-1. 処理温度および処理時間の検討：変異株の誘発最適条件を決定するため、 ht 1株を用いて種々の温度

Fig. 6. Examination of the Treatment Temperature for Heat Induction of ht 1.

The mutant, ht 1 grown in the MRT medium at 30°C was incubated for 10 minutes at various temperatures and were returned to 30°C for continued culture.

での誘発を行なった。Fig. 6は、30°C培養菌 $2 \sim 5 \times 10^7$ /mlの ht 1を種々の温度で10分間処理し、再び30°Cに戻して培養した場合の濁度の変化を示した。10分処理の場合、40°Cで最も顕著な溶菌が起こった。次に、種々の温度での処理時間について検討した結果をFig. 7に示した。処理温度が高いほど、短時間で誘発の起こることが明らかになった。

4-2. 継続的な高温処理による誘発：前節の実験で、処理温度が低くなるほど、誘発に必要な処理時間が長くなることがわかった。このことから、それ以下では誘発の起こらなくなる温度のあることが予想された。この点を確かめるため、30°Cで培養した ht 1株を種々の温度に移し、そのまま高温培養を続け、誘発の有無を調

Fig. 7. Examination of the Effective Time for Treatment at Various Temperatures.

After the ht 1 grown in the MRT medium at 30°C was treated for varying periods of time at 38°C, 40°C, 43°C and 50°C, the temperature was reduced to 30°C for further incubation.

○—○ treat 3', △—△ 5', ●—● 10',
▲—▲ 15', ⊙—⊙ 20', ⊖—⊖ 30'.

Fig. 8. Induction of *ht 1* Culturing Continuously at High Temperature.

The *ht 1* grown in the MRT medium at 30°C was transferred to various temperatures for continued incubation.

べた。結果を Fig. 8 に示した。継続的な高温培養の場合には、36°C 以上で誘発が起こった。35°C 以下では全く誘発は起こらず、誘発に必要な温度限界はかなり厳密であった。

Table I は、種々の温度での10分処理、および継続的な高温培養に際しての各培養上澄の酵素活生、およびファージ量を示す。継続高温培養の場合は、6時間培養の結果である。いずれも酵素活性は、ファージ量とはほぼ並行して増減した。Fig. 9 は、IAM 1043 原株の種々の温度で培養した場合の濁度の変化、および生

Table I. Heat Induction of *ht 1*

Heat treatment for					
10min			6hr		
Temp. (°C)	Enz. act. (mg/ml·hr)	Phage titer (p. f. u./ml)	Temp. (°C)	Enz. act. (mg/ml·hr)	Phage titer (p. f. u./ml)
30	1	1.3×10^5	30	1	8.2×10^4
34	1	2.7×10^5	35	2	3.0×10^5
37	2	1.9×10^7	36	15	4.1×10^8
40	11	2.1×10^9	38	11	8.0×10^7
42	8	8.9×10^8	40	8	7.6×10^6
45	8	8.6×10^8	43	6	2.5×10^6
50	7	6.5×10^8	45	1	1.5×10^6
			50	1	1.4×10^6

菌数を示す。菌の増殖は 37°C で最も良好であるが、培養温度が 40°C をこすと急速に悪くなる。*ht 1* 株の 40°C 以上の高温培養の場合、誘発が起こるまでの時間は長くなり、溶菌の程度、ファージ放出量等も悪くなるが、これは Fig. 9 の事実と考え合わせ、誘発温度に上限があるためではなく、高温で菌の代謝のおとろえる結果と考えられる。

ht 1 以外の 3 株の変異株について、同様に誘発条件の検討を行ない、種々の温度での誘発の起こる最短処理時間を示したものが Fig. 10 である。*ht 1*, *ht 2*, *ht 3* の 3 株は、温度感受性のパターンにおいて大差はないが、

Fig. 9. Effect of Culture Temperature on Proliferation of *ht 1*, a Mutant.

The bacteria grown in the MRT medium ($1 \sim 2 \times 10^8$ /ml) were diluted to 1:100 with the same medium in order to culture at various temperature for the measurement of the viable count (I) and the turbidity (II).

Fig. 10. Relationship between the Temperature and the Time of Treatment for Induction of the Heat Inducible Mutants.

Followings are the shortest treatment times required for induction of 4 strains of the mutant at various temperature.

○—○ ht 1, △—△ ht 2, ●—● ht 3,
○—○ ht 4.

Fig. 11. Effect of the Bacterial Age on Induction.

ht 1 was grown in the MRT medium and heat induction was performed at different times (A~E) at 43°C for 10 minutes. The solid line indicates the turbidity of the untreated strains and the dotted one shows the changes in turbidity following the induction. The numbers in the figure describe the viable count.

(I) MRT medium, A : 7.6×10^8 /ml, B : 1.2×10^7 /ml, C : 5.4×10^7 /ml, D : 8.2×10^7 /ml, E : 1.5×10^8 /ml.

(II) MRT medium adjusted pH value by adding 1/10 M phosphate buffer (pH 6.0), A : 7.6×10^8 /ml, B : 5.2×10^7 /ml, C : 8.0×10^7 /ml, D : 1.9×10^8 /ml, E : 3.0×10^8 /ml.

ht 4 のみ, さらに温度感受性が高い.

4-3. 菌の age と培地 pH 値の誘発への影響 : IAM 1043 の場合, 菌の age が対数増殖期初期ないし中期 (菌数 2×10^7 /ml ~ 1×10^8 /ml) にある間は, MC により良好な誘発が起こるが, 対数増殖期後期から休止期に入った培養では, 誘発が起こりにくい. 菌の age が, まだ対数増殖期にある間に誘発が起こりにくくなる事実は, 菌の増殖により培地 pH 値が急速に酸性に傾くためと考えられる (第1報⁽¹⁾). 溶原株からのファージ誘発による溶菌液調製の場合には, 誘発時の菌数をできるだけ高くする必要がありますので, 熱誘発性変異株での菌の age と, 培地 pH 値の誘発におよぼす影響についてさらに検討した.

Fig. 11 (I) は, 通常の MRT 培地で培養した ht 1 を, 7.6×10^8 /ml ~ 1.5×10^8 /ml まで種々の時点で一部を取り, 43°C, 10 分間の熱処理を行なった際の濁度の変化を示した. 培地の pH 値は, 培養開始時 6.5 に調整されたが, 10 時間の培養で 4.3 まで低下した. Fig. 11 (II) は, 同様の実験を 1/10 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を入れた

MRT 培地で行なったものである.

この場合の最終 pH 値は, 5.7 であった. Fig. 11 より明らかなように, 通常の MRT 培地では, 菌数が 1.5×10^8 /ml ですでに誘発が起きなくなっているのに対し, 緩衝液により pH 値の変動をおさえた場合には, 菌数 3.0×10^8 /ml でも著明な誘発の起こることがわかった. 休止期の培養では, pH 値を調整しても誘発は起こらなかった.

5. 熱誘発性変異株を用いた大量誘発

以上の各実験から熱誘発性変異株は, 誘発のための処理温度および処理時間にかかなりの幅をもっており, 大型タンクによる熱処理でも, 十分有効な誘発が起こることが予想された. そこで, 酵素精製に必要な大量の溶菌液を得るとともに, 大量誘発に際しての条件を検討する目的で, 100 l タンクによる誘発実験を試みた.

100 l の MRT 培地に, 1/20 量の

Fig. 12. Alterations in the Temperature and Turbidity of the Induction Experiment in 100 Litre Tank.

— temperature, ○—○ turbidity.

ht 1 株 1 夜培養液を加え、30°C で静置培養を行なった。濁度が Klett 比濁計で 100~120 に達したとき、熱処理を行なった。タンク内温度の調節は、タンク外層に 80°C の温水を循環させることにより行ない、その間、内容はゆるやかに攪拌した。処理時間は、タンク内の温度が 40°C を越えてから 20 分とした。タンク内温度の記録および濁度の変化を、Fig. 12 に示した。培地 pH 値の低下を考慮して、熱処理直前に 10N NaOH を用いて、pH 値を 6.8 に再調整した。溶菌終了後の pH 値は 5.0 であった。誘発後の溶菌のパターンは、試験管で行なった場合と本質的な差はなかった。溶菌液の活性ファージ数は $1.2 \times 10^{10}/\text{ml}$ に達し、酵素活性も試験管培養 (10~20 ml) の場合より、むしろ高い結果を示した。

考 察

溶原菌の熱誘発変異株を分離するためには、直接ファージを変異誘導処理するか、または溶原菌を変異誘導処理した後、ファージを放出させるかして、得られたファージについて高温で clear なプラークを作るものを分離する方法が用いられている^(4,5)。われわれは、直接溶原菌を NTG 処理する方法を用いて、生残菌中で熱処理により溶菌酵素を産生するものを変異株として分離した。

IAM 1043 は、プレート上での溶菌酵素による溶菌輪がきわめて顕著であること、実験目的が本来、良好な酵素生産株の分離を目ざしたものであることから、この方

法を用いた。溶原菌の熱誘発変異株は、プロファージの変異以外に、宿主菌の変異によっても得られることが報告されている^(9,10)。われわれの用いた分離方法からして、いずれの変異株も分離可能であるが、この点については、変異株から放出されたファージによる C-4304 株の再溶原化実験で、再溶原化された株がいずれも熱誘発性であることから、ファージの変異であることが確認された。別に、IAM 1043 のテンプレートファージを亜硝酸処理し、高温培養 (43°C) で clear なプラークを分離する方法も試みたが、IAM 1043 のファージのプラークは微小であり、また指示菌が高温で発育が悪いため、分離は困難であった。

現在までに分離された 4 株の変異株のうち、3 株はいずれも誘発の条件について、ほぼ同一の性質を持っており、36°C 以上の培養で溶菌が起こる。ht 4 については、温度に対する感受性がさらに高く、誘発の起こる最低温度は 35°C である。いずれの変異株も、40°C 以上に継続的に保温した場合には、溶菌は起こるが放出ファージ量、酵素活性ともに減少する。また、対数増殖期後期以後の培養を用いた場合も、誘発は起こりにくくなる。これらの現象は、いずれも高温、pH 値の低下、代謝生産物の蓄積等の理由により、菌体内でのファージの増殖が阻害される結果と考えられる。菌の age の誘発への影響については、同様のことが *L. salivarius* で観察されている⁽¹¹⁾。

われわれの分離した変異株は、4 株とも UV の誘発により、原株のような誘発は起こらなかった。λファージの熱誘発性変異株の UV 感受性については、Lieb⁽⁶⁾ がきわめて低い線量で誘発を起こす株について報告している。さらに、Lieb⁽⁴⁾、Horiuchi ら⁽⁵⁾ は、熱誘発性と UV 誘発性の関係について検討を加えており、Horiuchi ら⁽⁵⁾ は、彼らの分離した高温感受性変異株の UV 感受性が、野生株に比して高いものから低いものまで種々ある事実から、この二つの性質は特別な相互関係をもつものではないと考えている。われわれの変異株の場合、分離された 4 株全部が UV 耐性であり、UV 感受性について野生株と同様の性質を示す株、または野生株より感受性の

高い株は得られていない。これらの点は、 λ ファージで認められた一般的性質とは異なっているが、その理由は現在明らかでない。 λ ファージの場合、熱誘発変異株はレプレッサーを生産する C_I 遺伝子の変異として、 λ ファージの溶原状態維持機構の解明に利用されている。乳酸桿菌の場合、溶原株についての遺伝的研究は、現在ほとんど手がつけられていないが、さらに多くの変異株の分離により、 λ ファージに対比できる系の開発が期待されよう。

誘発条件の検討の結果、変異株は処理温度、処理時間に関して広い幅があり、大型タンクによる誘発も十分可能な条件をそなえていた。100l タンクでの溶菌はきわめて顕著であり、多量の溶菌液を容易に得ることができた。前培養の菌が対数増殖期のものであれば、接種から溶菌終了までの全過程は10時間内外で終わり、途中での雑菌の汚染はほとんど考慮する必要はない。IAM 1043 のファージ由来の溶菌酵素の場合、第2報⁽²⁾で示されたごとく、その作用範囲は比較的限定されており、特別な目的以外、酵素としての広い応用は期待できない。しかし、溶原株の熱誘発性変異株を利用した酵素材料の生産は、方法が簡単で特別な装置を要しないこと、全過程が短時間で終了し、酵素放出の時期をある程度任意に制御できること等の特長をもち、適当な溶原株が得られれば、方法としては十分将来性あるものと考えられる。

要 約

(1) *Lactobacillus casei* IAM 1043 を、ニトロソグアニジンで処理することにより、熱処理で誘発の起こる変異株4株を分離した。これらは、いずれもファージの変異株である。

(2) 変異株の熱誘発条件について検討した結果、3株は36°C以上、1株は35°C以上の温度条件で誘発が起こることがわかった。処理温度が高いほど、処理時間は短くてよい。

(3) 誘発による溶菌は、菌の age および培地 pH 値が関係し、休止期の菌を用いたときや、増殖期の菌でも培地 pH 値の低下が著しいときは、誘発が起こりにくくなる。

(4) 変異株を用いての大量誘発実験の結果、誘発の制御は容易であり、熱誘発変異株を用いての酵素材料の生産は、方法として十分実用化できることがわかった。

終りに、大量培養の条件設定に御協力をいただいた当研究所応用開発部、菅辰彦、水野和子両氏に感謝する。

本研究の一部は、昭和46年10月、日本農芸化学会関東支部大会において発表した。

- (1) 石和浩美, 桜井稔三: 農化, **46**, 245 (1972).
- (2) 横倉輝男, 石和浩美: 農化, **46**, 253 (1972).
- (3) R. Sussman et F. Jacob: *Compt. Rend.*, **254**, 1517 (1962).
- (4) M. Lieb: *J. Mol. Biol.*, **16**, 149 (1966).
- (5) T. Horiuchi and H. Inokuchi: *ibid.*, **23**, 217 (1967).
- (6) M. Levine: *Virology*, **3**, 22 (1957).
- (7) ELI C. Siegel and J. Marmur: *J. Virol.*, **4**, 610 (1969).
- (8) M. Lieb: *Science*, **145**, 175 (1964).
- (9) D. A. Goldthwait and F. Jacob: *Compt. Rend.*, **259**, 661 (1964).
- (10) E. P. Kirby, F. Jacob and D. A. Goldthwait: *Proc. Nat. Acad. Scie. USA*, **58**, 1903 (1967).
- (11) 桜井稔三, 遠山 清, 新井 浩: 日細誌, **26**, 473 (1971).