2 官能性リジン誘導体の J1 ファージに対する不活化作用

村田 晃, 佐本将彦, 深田久成, 和泉徹治,

山口義己, 加藤富民雄, 近藤道男*

(佐賀大学農学部農芸化学科, *佐賀大学理工学部化学科)

昭和 59 年 2 月 24 日 受 理

Inactivating-Effect of Bifunctional Lysine Derivatives on Phage J1

Akira MURATA, Masahiko SAMOTO, Hisanari FUKADA, Tetsuji IZUMI,

Yoshimi YAMAGUCHI, Fumio KATO and Michio KONDO*

*Department of Agricultural Chemistry, and *Department of Chemistry,
Saga University, Saga 840*

The synthesis and phage-inactivating activity of a homologous series of bifunctional lysine derivatives were previously reported. Here we report on the possible mechanism of phage-inactivating action of the derivatives, using tridecanedioyl-lysine ethyl ester and phage J1 as a model system. In several experiments, azelaoyl-, heptadecanedioyl- and eicosanedioyl-lysine ethyl esters were also used.

The addition of chelating agents, neutral amino acids, ribose, deoxyribose, bases, and nucleosides had little effect on the inactivation of phage by the derivatives. Metal cations, basic or acidic amino acids, and nucleotides inhibited the inactivation. In addition, binding of the derivatives was observed to DNA isolated from the phage. The results indicate that the interaction of ϵ -amino groups of the derivatives with the phosphate residues of phage DNA could be primarily responsible for the inactivation of phage. No differences were demonstrated in phage particles before and after inactivation by CsCl density gradient sedimentation or electron microscopy.

(Received February 24, 1984)

緒 言

塩基性アミノ酸のリジンにファージ不活化作用があることを見出した⁽¹⁻³⁾. さらに, リジンのファージ不活化作用の機構について追究し, ϵ -アミノ基がファージ不活化に関与する官能基であることを明らかにした⁽⁴⁾.

そのとき, リジンのカルボキシル基がブロックされ, α -および ϵ -の両アミノ基が遊離した形のリジン誘導体では, 塩基性度が強くなるにもかかわらず, ファージ不活化作用は発現されないことを知った⁽⁴⁾. このことから, 分子中にアミノ基が 2 つ遊離して存在するときには, アミノ基間の距離がファージ不活化に関係すると考え, ϵ -アミノ基間の距離をメチレン鎖 $-(CH_2)_n-$ で伸長する Fig.1 のような新しい形の 2 官能性リジン誘導体をデザインし, その $n=2\sim 15$ および 18 を合成^(5,6), それらのファージ不活化作用を試験した. その結果, メチ

レン鎖で伸長して ϵ -アミノ基間をある程度離すとファージ不活化作用が発現すること, 一般的にいて n が増大するにつれてファージ不活化作用が次第に大きくなること, などがわかった⁽⁷⁾.

本報文では, 2 官能性リジン誘導体のファージ不活化作用の機序を解明する一助として, トリデカンジオイル-リジンエチルエステルの J1 ファージに対する作用について研究した結果を報告する.

なお, 一部では, アゼラオイル-リジンエチルエステル ($n=7$), ヘプタデカンジオイル-リジンエチルエステル ($n=15$), およびエイコサンジオイル-リジンエチルエステル ($n=18$) も使用した.

実 験 方 法

1. リジン誘導体の合成 通常のペプチド合成法を用いて, ϵ -ベンジルオキシカルボニル-L-リジンエチル

Fig.1. Chemical Structure of Bifunctional Lysine Derivative ($n=2\sim 15$ and 18)

エステルとアゼライン酸，トリデカン二酸，ヘプタデカン二酸，およびエイコサン二酸を縮合させた。次いで，接触還元によって ϵ -ベンジルオキシカルボニル基を除去し，目的とするアゼラオイル-L-リジンエチルエステル ($n=7$)，トリデカンジオイル-L-リジンエチルエステル ($n=11$)，ヘプタデカンジオイル-L-リジンエチルエステル ($n=15$)，およびエイコサンジオイル-L-リジンエチルエステル ($n=18$) を得た（以下， n の数で略記する）。なお，合成関係の詳細はすでに報告している^(5,6)。

2. ファージ J1 ファージ (ATCC 27139-B) を使用した。宿主菌は *Lactobacillus casei* S1 (ATCC 27139) である。

3. ファージの培養 ファージおよび宿主菌の培養は，MRT 培地⁽⁸⁾を用いて，既報の方法⁽⁹⁾で行った。培養の温度は 37°C。

4. ファージの計数 J1 ファージに適するように改変した，重層法によるブラック・カウント法⁽⁸⁾によった。

5. ファージの不活化 リジン誘導体は，水に対する溶解度が低いため，エチルアルコールに溶解させてストック溶液 (2×10^{-2} M) を調製した。

ファージの不活化は，0.02 M トリス-塩酸バッファー (pH 7.4) に，ファージ (最終 4×10^7 PFU/ml) とリジン誘導体溶液を混和し，37°C で 30 分間インキュベートすることによって行った（エチルアルコールの最終濃度は 5% (v/v)，この濃度のエチルアルコールはファージに影響を与えない⁽⁷⁾）。不活化反応の停止は，反応混合溶液の一部をとり，氷冷した希釈液で 100 倍以上希釈することによって行った。希釈液の組成は既報⁽⁸⁾。

6. ファージの分離・精製 高速遠心と低速遠心を繰り返す分画遠心法によって，ファージ溶菌液からファージを分離・精製した。超遠心機は日立の 55 P-72 を使

用した。

7. ファージ DNA の調製 フェノール法によって，精製ファージ溶液からファージ DNA を分離した。DNA 溶液に残存するフェノールは，バッファーに対し透析して除いた。なお，コロイド滴定法⁽¹⁰⁾を用いて，DNA のリン酸残基を定量した。

8. 塩化セシウム密度勾配遠心 試料溶液に CsCl を溶解させ，溶液の密度が 1.5 g/ml になるように調整した。これを水平ロータ（日立 RPS 40）にセット，5°C，25,000 rpm で 15 時間遠心した。次いで，自動液体分取装置（東洋科学産業 ALC-21）および紫外線モニター（エムエス機器 111）を用いて，280 nm および 254 nm の吸収度を測定した。また，分画採取し，適宜密度を測定した。

密度は，アタゴアッペ屈折計を用いて屈折率を測定し，関係式から求めた。

9. 電子顕微鏡 リンタングステン酸 (1%，pH 7.0) でネガティブ染色した標本を日本電子の電子顕微鏡 (JEM-100 B) で観察した。

10. その他 ファージに関するその他の実験方法は，Adams⁽¹¹⁾ が記載した標準法に従った。

実験結果および考察

1. トリデカンジオイル-L-リジンエチルエステル (11) のファージに対する不活化作用

11 の J1 ファージに対する不活化作用について検討した。

Fig. 2 に不活化曲線を示す。不活化曲線の形から，不活化反応速度は，反応の初期に速く，その後は次第に減少することがわかる。たとえば， 8×10^{-5} M の場合，初めの 5 分間で 90% が不活化されるが，99% 不活化に達するには，その後 25 分を要している。

ファージ不活化反応の可逆性を検するために，不活化反応の途中，反応液から 11 を除去した場合に，不活化ファージの活性回復がみられるか否かを検討した。その結果，Fig. 3 に示すように，反応の初期でも，不活化ファージの活性回復はみられなかった。このことから，不活化反応は，不可逆的なものであると考えられる。

2. 11 によるファージ不活化に影響する因子

11 の J1 ファージに対する不活化作用の機序を明らかにする一助として，ファージ不活化に影響する因子について検討した。なお，特記しない限り， 6×10^{-5} M の

Fig. 2. Inactivation Curves of Phage J1 by Tridecanedioyl-Lysine Ethyl Ester (11). Phage (4×10^{-7} PFU/ml) was incubated with different concentrations of 11 in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, at 37°C. Concentration of 11: ----, 0 M; ○, 2×10^{-5} M; ●, 4×10^{-5} M; △, 6×10^{-5} M; ▲, 8×10^{-5} M; □, 1×10^{-4} M.

Fig. 3. Irreversibility of 11-Induced Inactivation of Phage J1. Phage was incubated with 6×10^{-5} M of 11. At the times, as indicated in the figure, an aliquot of the reaction mixture was diluted 100-fold with the Tris-HCl buffer and further incubated.

11 と J1 ファージを 37°C で 30 分間インキュベートし、ファージ生存率が 10% のときを対照とした。

(1) pH トリス-塩酸バッファの pH を変え、また 11 の濃度も変えて、pH の影響について検討した。結果は Fig. 4 に示す。pH が 7.0 から 8.6 の範囲では、pH が高くなるにつれて不活化作用は次第に増大した。

なお、以下の実験は、生理的な pH 7.4 で行ったもの

Fig. 4. Effect of pH on Inactivation of Phage J1 by 11. Phage was incubated in different pHs of 0.02 M Tris-HCl buffer for 30 min at 37°C. Concentration of 11: ■, 3×10^{-5} M; △, 6×10^{-5} M; ▲, 8×10^{-5} M.

Fig. 5. Effect of Temperature on Inactivation of Phage J1 by 11. Phage was incubated with 6×10^{-5} M of 11 in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, for 30 min. Temperature (°C): ○, 0~4; ●, 20; △, 30; ▲, 37; □, 40; ■, 43; ○●, 47.

である。

(2) 温度 温度の影響について検討した。結果は Fig. 5 に示す。温度が高くなるにつれて不活化作用は次第に増大した。

(3) 金属イオン 1価および2価の金属イオンの

Table I. Effect of Metal Ions on Inactivation of Phage J1 by Tridecanedioyl-Lysine Ethyl Ester (11)

Addition	Concn. (M)	Survival (%)
None	0	10
Na ⁺	1×10^{-2}	20~ 30
	1×10^{-3}	10
K ⁺	1×10^{-2}	20~ 30
	1×10^{-3}	10
Mg ²⁺	1×10^{-3}	90~100
	1×10^{-4}	70~ 80
	1×10^{-5}	50~ 60
	1×10^{-6}	35~ 50
	1×10^{-7}	20~ 30
	1×10^{-8}	10
Mn ²⁺	1×10^{-3}	90~100
	1×10^{-4}	70~ 80
	1×10^{-6}	40~ 50
	1×10^{-8}	10
Ca ²⁺	1×10^{-3}	90~100
	1×10^{-4}	70~ 80
	1×10^{-6}	40~ 50
	1×10^{-8}	10
Cu ²⁺	1×10^{-6}	— ^a
	1×10^{-7}	15~ 20
	1×10^{-8}	10
Fe ²⁺	1×10^{-6}	— ^a
	1×10^{-7}	15~ 20
	1×10^{-8}	10

Phage (4×10^7 PFU/ml) was incubated with 6×10^{-5} M of 11 and an additional reagent in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, for 30 min at 30°C. The survival of the control (11-free, containing the reagent) is represented as 100%.

^a No data were available due to the phage-inactivating effect of the reagent itself.

影響について検討した。結果は Table I に示す。

1価カチオンの Na⁺ および K⁺ は、高濃度で不活化を阻害したが、 1×10^{-3} M では不活化に影響を及ぼさなかった。

2価カチオンの Mg²⁺, Mn²⁺ および Ca²⁺ は、 1×10^{-3} M で不活化を完全に阻害した。さらに、 1×10^{-7} M という低濃度でも不活化を阻害した。Cu²⁺ および Fe²⁺ は、それ自体のファージ不活化作用のために、低濃度でしか実験できなかったが、不活化を阻害するという傾向はうかがえた。

これに対して、金属キレート剤の EDTA およびクエン酸ナトリウムは、ファージ不活化にほとんど影響を及ぼさなかった。

Table II. Effect of Amino Acids on Inactivation of Phage J1 by 11

Addition	Concn. (M)	Survival (%)
None	0	10
Basic Arg	1×10^{-2}	90~100
	1×10^{-3}	25~ 35
	1×10^{-4}	10~ 15
	1×10^{-2}	90~100
	1×10^{-3}	25~ 35
	1×10^{-4}	10~ 15
Orn	1×10^{-2}	40~ 60
	1×10^{-3}	20~ 30
	1×10^{-4}	10~ 20
	1×10^{-2}	10~ 20
His	1×10^{-3}	10~ 15
	1×10^{-4}	10
Acidic Glu	1×10^{-2}	40~ 60
	1×10^{-3}	20~ 25
	1×10^{-4}	10~ 15
	1×10^{-2}	30~ 60
Asp	1×10^{-3}	10~ 20
	1×10^{-4}	10
Neutral Gly	1×10^{-2}	15~ 20
	1×10^{-3}	10~ 15
	1×10^{-4}	10
	1×10^{-2}	15~ 20
Ala	1×10^{-2}	15~ 20
Hyp	1×10^{-2}	15~ 20
Ile	1×10^{-2}	10~ 15
Leu	1×10^{-2}	10~ 15
Met	1×10^{-2}	10~ 20
Phe	1×10^{-2}	10
Pro	1×10^{-2}	10
Ser	1×10^{-2}	10
Thr	1×10^{-2}	10~ 15
Try	1×10^{-2}	10
Val	1×10^{-2}	10~ 15

See the legend for Table I.

(4) アミノ酸 塩基性、酸性および中性のアミノ酸の影響について検討した。結果は Table II に示す。塩基性度の強いアルギニン、リジンおよびオルニチンは、ファージ不活化を阻害した。とくに、高濃度のアルギニンおよびリジンは、不活化を完全に阻害した。これに対して、塩基性度の弱いヒスチジンは、不活化にほとんど影響を及ぼさなかった。

アルギニンおよびリジンによってファージ不活化が阻害されるのは、アルギニンおよびリジンそれ自体が有している不活化作用が、それぞれの高濃度では発現されないという観察^(4,12)、ならびに、本研究の契機となった観察(リジンのカルボキシル基がブロックされ、α-および

ϵ -の両アミノ基が遊離した形のリジン誘導体では、塩基性は強くなるにもかかわらず、ファージ不活化作用は発現されない)と関係が深いと考えられる。

酸性アミノ酸のグルタミン酸およびアスパラギン酸もファージ不活化を阻害した。この場合の阻害は、11の ϵ -アミノ基が酸性アミノ酸のカルボキシル基によって中和されるためと考えられる。

一方、アミノ基とカルボキシル基が中和された形の中性アミノ酸は、ファージ不活化にほとんど影響を及ぼさ

Table III. Effect of Bases, Nucleosides, and Nucleotides on Inactivation of Phage J1 by 11

Addition	Concn. (M)	Survival (%)
None	0	10
Bases		
Adenine	1×10^{-2}	10~15
	1×10^{-3}	10
Guanine	1×10^{-2}	— ^a
	1×10^{-3}	10
Cytosine	1×10^{-2}	10~15
	1×10^{-3}	10
Uracil	1×10^{-2}	10~20
	1×10^{-3}	10
Thymine	1×10^{-2}	10~20
	1×10^{-3}	10
Nucleosides		
Adenosine	1×10^{-2}	15~20
	1×10^{-3}	10
Guanosine	1×10^{-2}	30~40
	1×10^{-3}	10~15
Cytidine	1×10^{-2}	10~20
	1×10^{-3}	10
Uridine	1×10^{-2}	40~60
	1×10^{-3}	10~20
Thymidine	1×10^{-2}	15~20
	1×10^{-3}	10
Nucleotides		
5'-Adenylic acid	1×10^{-2}	50~75
	1×10^{-3}	20~30
5'-Guanylic acid	1×10^{-2}	90~100
	1×10^{-3}	40~55
5'-Cytidylic acid	1×10^{-2}	90~100
	1×10^{-3}	30~50
5'-Uridylic acid	1×10^{-2}	90~100
	1×10^{-3}	35~50
5'-Thymidylic acid	1×10^{-3}	90~100
	1×10^{-3}	30~50

See the legend for Table I.

^a No data were available due to the poor solubility of the reagent.

なかった。

(5) 塩基, ヌクレオシド, ヌクレオチド 核酸の構成成分である塩基, ヌクレオシドおよびヌクレオチドの影響について検討した。結果は Table III に示す。

塩基は、ファージ不活化にほとんど影響を及ぼさなかった。

塩基に糖が結合したヌクレオシドは、グアノシンおよびウリジンの高濃度においてファージ不活化の阻害がみられたが、それ以外の場合には、不活化にほとんど影響がみられなかった。

これに対して、ヌクレオシドにリン酸が結合したヌクレオチドでは、5'-アデニル酸を除いて、高濃度でファージ不活化の完全阻害がみられた。また、 1×10^{-3} M においても、かなりの阻害がみられた。一方、この濃度において、遊離の糖 (D-リボースおよび 2'-デオキシ-D-リボース), ならびに遊離のリン酸 (KH_2PO_4 および NaH_2PO_4) は、ファージ不活化にほとんど影響を及ぼさなかった。

以上の結果は、ヌクレオチド構造のなかにあるリン酸基と 11 の ϵ -アミノ基が相互作用することを示している。

3. 11 とファージ DNA の相互作用

11 の ϵ -アミノ基とヌクレオチドのリン酸基との相互作用が示されたので、次に、ポリヌクレオチドである DNA との相互作用について検討した。DNA としては、仔ウシ胸腺 DNA (Sigma の highly polymerized) および J1 ファージから分離した DNA を用いた。

実験は、①DNA と 11 を一定時間ブレインキューベートする、②一定量のファージを加え一定時間インキューベートする、③反応混合溶液に残存する遊離ファージを計数する方法⁽¹³⁾によった。この場合、ファージの残存率は、未反応の 11 が少ない (結合した 11 が多い) ほど高くなる。

J1 ファージ DNA の結果を Table IV に示す。DNA 濃度が増大するにつれてファージ残存率は高くなり、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、加えたファージのほとんどが残存した。このことは、J1 ファージ DNA と 11 が相互作用することを示している。また、仔ウシ胸腺 DNA についても同様の結果が得られた。

このとき、DNA のリン酸残基の定量を行ったが、反応前と比べ、反応後にリン酸残基が減少していた。したがって、DNA と 11 の ϵ -アミノ基との相互作用は、

Table IV. Interaction of Phage DNA and 11 as Determined by Inhibition of Phage-Inactivating Effect

11 (M)	DNA ($\mu\text{g/ml}$)	Free phage remaining (%)
0	0	100
0	3	100
6×10^{-5}	0	10
6×10^{-5}	0.01	10
6×10^{-5}	0.03	10~20
6×10^{-5}	0.1	30~40
6×10^{-5}	0.3	50~60
6×10^{-5}	1	70~80
6×10^{-5}	3	90~100

DNA isolated from phage J1 and 11 were pre-incubated for 15 min at 37°C. To the incubation mixture was added phage J1 (final 4×10^5 PFU/ml), and the mixture was further incubated for 30 min at 37°C. The free phage remaining was assayed. The free phage is a sensitive indicator of the concentration of uncombined 11.

Table V. Comparative Inactivating-Effect on Phage J1 of Azelaoyl- (7), Tridecanedioyl- (11), Heptadecanedioyl- (15) and Eicosanedioyl-Lysine Ethyl Ester (18)

Concn. (M)	Survival (%)			
	Compound			
	7	11	15	18
1×10^{-3}	0	—	—	—
3×10^{-4}	10	—	—	—
1×10^{-4}	60	0	—	—
6×10^{-5}	80	10	—	—
3×10^{-5}	100	50	—	—
1×10^{-5}	—	100	0	—
3×10^{-6}	—	—	10	0
1×10^{-6}	—	—	80	10
6×10^{-7}	—	—	100	40
3×10^{-7}	—	—	—	100

Phage was incubated with different concentrations of 7, 11, 15 or 18. Also see the legend for the Table I.

DNA のリン酸基を介したものであると考えられる。

なお、この実験において DNA の高濃度 (10~100 $\mu\text{g/ml}$) では、白色糸状の浮遊物が肉眼的に観察された。これは、DNA と 11 の相互作用によって形成された不溶性の複合体であると考えられる。

4. 不活化ファージの密度勾配遠心および電子顕微鏡的観察

精製した J1 ファージと 11 をインキュベートし、フ

Fig. 6. Sedimentation Profiles of Phage J1 by CsCl Density Gradient Centrifugation. Phage solution was adjusted with CsCl to a density of 1.5 g/ml. This was centrifuged in a swing bucket rotor at 25,000 rpm for 15 hr at 4°C. —, absorbance; —, density.

ァージの約 90% が不活化されたものについて、密度勾配遠心を行い、また電子顕微鏡で観察した。

Fig. 6 に塩化セシウム平衡密度勾配遠心の沈降プロファイル (280 nm) を示す。このプロファイルは、活性ファージと不活化ファージの間で密度に差異がないことを示している。また、254 nm で測定したプロファイルにおいても両者に差異が認められなかった。

さらに、同じ試料を電子顕微鏡で観察したが、形態学的に、活性ファージとの違いは認められなかった。また、ゴースト化したファージも観察されなかった。

以上の結果は、11 によるファージの不活化がコート・タンパクの変性や破壊、ファージ DNA の放出を伴わないことを示している。

5. アゼラオイル-リジンエチルエステル (7)、ヘプタデカンジオイル-リジンエチルエステル (15)、およびエイコサンジオイル-リジンエチルエステル (18) のファージ不活化作用の機構

上述の 11 で得られた結果の普遍性を検するために、 n の相違する 7, 15 および 18 を選び、11 と比較検討した。

Table V に 7, 11, 15 および 18 の J1 ファージに対する不活化作用を示す。 n が大きいほど不活化作用が大きいことは既報⁽⁷⁾しているが、ファージ生存率 10% の濃度を比較すると、7 と 11 の間で 5 倍、11 と 15 の間で 20 倍、15 と 18 の間で 3 倍ほどファージ不活化作用が大きくなっていることがわかる。

7, 15 および 18 の J1 ファージに対する不活化作用は、11 の場合と同様であった。すなわち、不活化反応速度は反応の初期に速く、その不活化反応は不可逆的であ

Table VI. Effect of Nucleotides on Inactivation of Phage J1 by 7, 11, 15, and 18

Addition	Concn. (M)	Survival (%)			
		Compound			
		7	11	15	18
None	0	10	10	10	10
5'-Adenylic acid	1×10^{-2}	50~70	50~75	70~80	80~90
	1×10^{-3}	40~50	20~30	40~80	30~50
5'-Guanylic acid	1×10^{-2}	90~100	90~100	90~100	90~100
	1×10^{-3}	60~80	40~55	40~50	50~80
5'-Cytidylic acid	1×10^{-2}	90~100	90~100	90~100	90~100
	1×10^{-3}	50~70	30~50	40~55	30~40
5'-Uridylic acid	1×10^{-2}	90~100	90~100	90~100	90~100
	1×10^{-3}	60~70	35~50	40~60	30~40
5'-Thymidylic acid	1×10^{-2}	90~100	90~100	90~100	90~100
	1×10^{-3}	50~80	30~50	60~70	50~60

Phage was incubated with 3×10^{-4} M of 7, 6×10^{-5} M of 11, 3×10^{-6} of 15 or 1×10^{-6} M of 18 in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, for 30 min at 37°C. Also, see the legend for Table I.

Table VII. Interaction of Phage DNA and 7, 11, 15, and 18 as Determined by Inhibition of Phage-Inactivating Effect

DNA (μ g/ml)	Free phage remaining (%)			
	Compound			
	7	11	15	18
0	10	10	10	10
0.01	—	10	10	10
0.03	10	10~20	10~20	10~20
0.1	10~20	30~40	30~40	35~45
0.3	20~30	50~60	50~65	60~70
1	30~40	70~80	90~100	90~100
3	40~60	90~100	—	—
10	60~70	—	—	—
30	90~100	—	—	—

DNA isolated from phage J1 was preincubated with 3×10^{-4} M of 7, 6×10^{-5} M of 11, 3×10^{-6} M of 15 or 6×10^{-6} M of 18 for 15 min at 37°C. Also, see the legend for Table IV.

った。

また、ファージ不活化に及ぼす諸因子の影響も、pH、温度、金属イオン、アミノ酸、塩基、ヌクレオシドなどについて検討したのが、11の場合とはほぼ同様であった(大きい違いは、ヌクレオシドのうちグアノシンおよびウリジンが 1×10^{-2} M で不活化を著しく阻害したことがある。しかし、 1×10^{-3} M では、この阻害はほとんどみられない)。

ヌクレオチドは、Table VI に示すように、5'-アデニル酸を除いて、 1×10^{-2} M でファージ不活化を完全に阻害した。また、 1×10^{-3} M においてもかなり大きい阻害を示した。

さらに、Table VII に示すように、ファージ DNA との相互作用も示された(ファージ残存率が 100% になる DNA の濃度が相違するのは、 n が大きいほど低濃度で有効なためである)。

以上の諸結果は、2 官能性リジン誘導体のファージに対する不活化作用は、 n が違っても基本的に同じであって、 ϵ -アミノ基と DNA のリン酸基との相互作用がファージ不活化に関係していることを示している。

既報⁽⁴⁾のリジンの場合も、これと同じような機序が考えられたが、ファージ不活化作用は、2 官能性リジン誘導体のほうが桁違いに大きい。リジンと 7 では約 70 倍、最大の作用を示す 18 とでは 20,000 倍も相違している^(4,7)。

これは、リジンの場合、2つのアミノ基のうち α -アミノ基はカルボキシル基で中和されていて ϵ -アミノ基だけが遊離しているのに対して、2 官能性リジン誘導体では、分子の両末端にそれぞれ ϵ -アミノ基があることによると考えられる。しかも、前報⁽⁷⁾で考察したように、 n の偶数、奇数によって2つの ϵ -アミノ基の配向性が異なり、奇数で同一方向のときにファージ不活化作用がより大きいのである。また、メチレン鎖で伸長された2つの ϵ -アミノ基間の距離が長いほどファージ DNA のリン酸基との適合性が増すことも考えられる。

さらに、 n が大きい場合、長いメチレン鎖の疎水性による影響が大きくなることを考えなければならない。ちなみに、2 官能性リジン誘導体の両方の ϵ -アミノ基をブロックしても、かなり強いファージ不活化作用が残存していることを示す予備的なデータを得ている。

要 約

2つの ϵ -アミノ基の間を $-(CH_2)_n-$ で伸長した2官能性リジン誘導体のファージ不活化作用の機序を明らかにする一助として、トリデカンジオイル-リジンエチルエステル(11)のJ1ファージに対する不活化作用について研究し、次のことがわかった。

金属キレート剤、中性アミノ酸、リボース、デオキシリボース、リン酸塩、塩基、およびヌクレオチドは、11によるファージ不活化にほとんど影響を及ぼさない。これに対して、金属イオン、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸、およびヌクレオチドは、不活化を阻害する。ファージDNAおよび仔ウシ胸腺DNAは、11と相互作用する。

これらのことから、11の ϵ -アミノ基とDNAのリン酸基との相互作用が、ファージ不活化に関係していると考えられた。

このことは、アゼラオイル-リジンエチルエステル(7)、ヘプタデカンジオイル-リジンエチルエステル(15)、およびエイコサンジオイル-リジンエチルエステル(18)についても確かめられた。

なお、不活化ファージと活性ファージの間で、密度および形態に差異は認められなかった。

終りにのぞみ、ご助言・ご討議をいただいた本学教養部化学教室の光安舒夫助教授に深謝する。研究費の大半は、文部省の特定研究経費によった。本研究の要約は、

日本農芸化学会大会(昭和58年3月30日、仙台)および同学会西日本・関西両支部合同大会(昭和58年10月15日、広島)で発表した。

- (1) A. Murata, M. Odaka and S. Mukuno: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 477 (1974).
- (2) 村田 晃, 尾高 守, 椋野正一, 猿野琳次郎: *Amino Acid・Nucleic Acid 発酵と代謝*, No. 30, 1 (1974).
- (3) 村田 晃, 田中啓志, 椋野正一, 尾高 守, 源野昭治, 加藤富民雄, 猿野琳次郎: *農化*, **52**, 393 (1978).
- (4) 村田 晃, 田中啓志, 中津海和正, 源野昭治, 加藤富民雄, 猿野琳次郎, 近藤道男: *農化*, **52**, 385 (1978).
- (5) M. Kondo, Y. Shimizu and A. Murata: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 913 (1982).
- (6) M. Kondo, K. Miyazaki, Y. Yada, H. Horimoto, M. Samoto and A. Murata: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1263 (1984).
- (7) 村田 晃, 佐本将彦, 深田久成, 今津京子, 西節子, 加藤富民雄, 近藤道男: *農化*, **58**, 471 (1984).
- (8) 村田 晃, 添田栄一, 猿野琳次郎: *農化*, **43**, 311 (1969).
- (9) 村田 晃, 辻 正信, 添田栄一, 猿野琳次郎, 桜井稔三: *農化*, **46**, 35 (1972).
- (10) 千手諒一: 「コロイド滴定法」, 南江堂, 1969.
- (11) M. H. Adams: "Bacteriophages," Interscience Publishers, 1959, p. 443.
- (12) 村田 晃, 田中啓志, 渋谷 強, 今津京子, 加藤富民雄, 近藤道男: *農化*, **53**, 157 (1979).
- (13) D. W. Watson and W. L. Bloom: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **81**, 29 (1952).