

Escherichia coliのS系ファージの吸着および増殖に影響する因子

誌名	佐賀大学農学部彙報
ISSN	05812801
巻/号	72
掲載ページ	p. 105-113
発行年月	1992年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



Escherichia coli の S 系ファージの吸着 および増殖に影響する因子

呉 偉巍*・田中宏一郎・吉永 克則
加藤富民雄・村田 晃
(応用微生物学研究室)
平成 3 年 10 月 31 日受理

Effects of some factors on adsorption and growth of S-phages for *Escherichia coli*

Wei-Wei WU*, Koichiro TANAKA, Katunori YOSHINAGA,
Fumio KATO and Akira MURATA
(Laboratory of Applied Microbiology)
Received October 31, 1991

Summary

We previously reported the isolation and characterization of phages S1 and S2 for a genetically modified serine-producing *Escherichia coli* K-12.

This paper describes the effects of some factors on the stability, adsorption and growth of phages S1 and S2 in relation to the control of phages in the fermentation industries. All experiments were done in the nutrient broth.

Phage S2 was stable and phage S1 was less stable at 37°C. Also, phage S2 was less heat-labile than phage S1. Both phages were stable at pH 7.0 and became gradually less stable at lower or higher pH.

Phage S1 was rapidly adsorbed on its host cells, while phage S2 was slowly adsorbed. Both phages were adsorbed at maximal rates at 37°C. The adsorption rates were gradually decreased at lower or higher temperatures. K⁺, Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ enhanced the adsorption rates of phages. Tryptophan and serine also enhanced the adsorption rates.

With phage S1 the latent period was long and the burst size was large, while the latent period was short and the burst size was small with phage S2. The growth of both phages was optimal at 37°C. At lower temperatures than 37°C, the latent periods were extended, but the burst sizes were not markedly decreased. However, the burst sizes were extremely decreased at 20°C. At higher temperatures, no significant differences were found in the latent periods, but the burst sizes were gradually decreased. Phage S1 failed to grow at 45°C, and phage S2 did at 50°C. The growth of both phages was optimal at pH 7.0. With phage S1 the latent period was gradually extended and the burst size was gradually decreased at lower or higher pH. With phage S2 they were not markedly affected by pH. However, both phages failed to grow at pH 4.0 or pH 10.0.

Key words: *Escherichia coli* K-12, phage S1, phage S2, adsorption of phage, growth of phage.

* 中華人民共和国西安市 西北大学生物系微生物学科

結 言

細菌を利用する発酵工業では、莫大な数の細菌が連日のように培養されている。このことは、細菌を侵すファージに絶好の繁殖条件を提供していることになる。実際に、ほとんど全ての細菌利用発酵工業において、ファージ汚染による発酵生産の異常が起こり、被害を受けることが判明して、ファージの研究は、発酵学の領域で重要なものとなり多数の研究が行われた^{1,2,3)}。

ファージの防除対策の一般的な方法は、異常の起った発酵を治癒する方法がないために、次のような方法がとられる。すなわち、数の増えたファージを完全に不活化した後にその異常発酵培養液を廃棄する。また、工場内に充満したファージを加熱や化学薬品によって完全に不活化する。次いで、発生したファージに抵抗性の変異菌株を分離し、その菌株を使用して発酵を再開する。

これが一般的な方法であるが、これには様々な問題点がある。また、この方法は、あくまでも予防的な方法であって、ファージに侵された発酵を治癒する方法ではない。つまり、培養液におけるファージの作用を阻止する方法はないのが実情である。

発酵学領域において、ファージに関する研究はいまだに重要な課題の一つであり、新しい観点からのファージ防御法の確立が待たれている。バイオテクノロジーの進展に伴って、遺伝子組換え技法などで造成された細菌の工業的使用が拡大されること、発酵の連続化が拡大されることなどを考えると、ファージ防御に関する研究は、ますます重要となるのである。

著者らは、セルフクロニングにより、L-セリンの生産能を増強した *Escherichia coli* K-12 の溶菌液から、2種類のファージを分離し、S 1 および S 2 と命名した。これを契機として、アミノ酸生産を初めその他の有用物質生産において多大の被害を与え、それらの発酵を不安定にする原因となっているファージの防御を目的として、その一つのモデルとして、この遺伝子組換え技法によって造成された *Escherichia coli* K-12 の S 1 および S 2 ファージを取上げ、研究している^{4,5,6)}。

ファージ感染の過程は、一般に、吸着→核酸注入→メッセンジャーRNA合成→初期蛋白質合成→ファージDNA複製→後期蛋白質合成→成熟→溶菌→ファージ放出、という順序で進行する。したがって、ファージの菌への吸着あるいはファージ感染菌細胞内でのファージ増殖を阻害することができれば、ファージに侵された発酵を治癒する一つの方法となり得る。

本報では、ファージの吸着および増殖の阻害を目指して、S 1 および S 2 ファージの吸着および増殖に影響する因子について研究した結果を報告する。

方 法

1 ファージ

ファージは、L-セリン生産 *Escherichia coli* K-12 の溶菌液から分離した S 1 および S 2 ファージを使用した^{4,5,6)}。宿主菌は、*Escherichia coli* K-12 を使用した。

2 試 薬

アミノ酸は、宝興産の製品を使用した。その他の試薬は、和光純薬工業の製品を使用した。

3 培 地

通常のブイヨン培地を使用した。その組成は、ポリペプトン (大五栄養化学) 10 g, 肉エキス (極東製薬工業) 10 g, NaCl 5 g, CaCl₂·2H₂O 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, 純水1000 ml で、pH は7.0である。

4 培 養

斜面培養の 1 白金耳を液体培地に接種し、モノー式振盪培養装置（中島製作所）を使用して約 15 時間振盪培養した。更に、新しい液体培地に 2 容量%接種して 3～4 時間振盪培養し、培養液の 660nm における吸光度が約 0.3 になったものを対数増殖期の細胞として使用した。培養温度は 37°C である。

5 培養濁度の測定

L 型試験管を用いて培養し、スペクトロニック 20 光電比色計（島津-Bausch-Lomb）を用いて、660nm の吸光度を測定した。ブランクは、未接種の培地である。

6 ファージの計数

ファージの計数は、重層法によるブランクカウント法によった⁷⁾。

7 ファージの吸着

宿主菌 (2×10^8 cell/ml) にファージを m.i.o. 約 1 になるように混和し、37°C で所定の時間吸着させた。次いで、氷冷した希釈液で 100 倍希釈し、遠心分離 (8,000 rpm, 15 分)、上澄みの未吸着ファージを計数して、ファージの吸着率を求めた。また、一部の試験では、0.02M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄した菌を用いて、前記のようにしてファージの吸着率を測定した。希釈液の組成は、 KH_2PO_4 1.35 g, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.56 g, NaCl 1.00 g, ゼラチン 0.03 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, 純水 1000ml で、pH は 7.0 である。

8 ファージの増殖

一段階増殖実験法で行った。すなわち、宿主菌 (2×10^8 cells/ml) にファージを m.i.o. 約 0.1 になるように混和し、37°C で 3 分間吸着させた。次いで、抗ファージ血清を混和し、2 分間中和反応を行った後、その一部をブイオン培地に取り、感染菌数が約 2×10^3 cells/ml になるようにした。これを 37°C で培養し、経時的に感染中心数 (感染菌 + 遊離ファージ数) を計数した。

9 そ の 他

ファージに関するその他の実験方法は、Adams⁷⁾ がまとめて記載した標準法によった。

結 果

1 ファージの温度安定性

まず、S 1 および S 2 ファージのブイオン培地における安定性と、それに及ぼす温度および pH の影響について検討した。ファージは、普通の培地では室温で安定である。しかしながら、およそ 45°C 以上の温度ではファージの不活化が始まる。この温度付近で多くの蛋白質の変性が起こり始めるので、ファージの不活化の主な原因は、ファージ蛋白質の変性によると考えられる。もちろん、ファージの種類によって温度安定性は相違する。

Fig. 1 に、S 1 および S 2 ファージの温度安定性について検討した結果を示す。S 1 ファージは、比較的不安定であって、37°C でも徐々に不活化された。55°C では、120 分後におよそ 80% が不活化された。これに対して、S 2 ファージは、比較的安定であり、55°C、120 分でもおよそ 30% が不活化されるにすぎなかった。

2 ファージの pH 安定性

ファージは、室温では pH 6 から 8 の範囲で安定である。低温では、この範囲が pH 4～5 から 9～10 にまで広がる。

Fig. 2 に、S 1 および S 2 ファージの pH 安定性について検討した結果を示す。両ファージとも、pH 7 が最も安定で、pH が酸性側あるいはアルカリ側に移るにつれて次第に不安定になっ

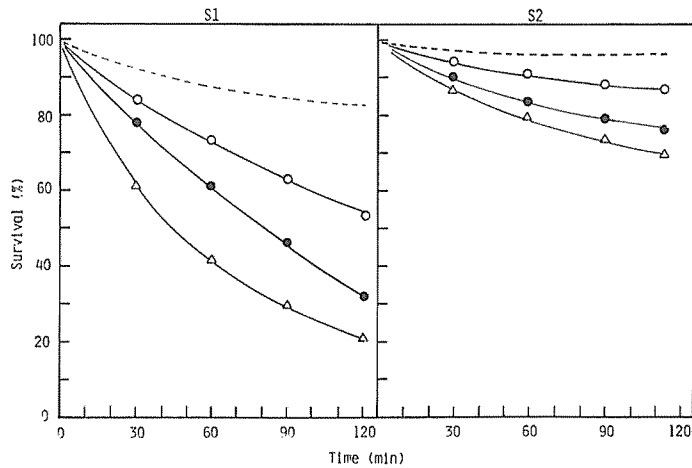


Fig. 1 Thermal stability of S-phages. Phages (2×10^8 PFU/ml) were incubated in nutrient broth (pH 7.0) at different temperatures. Temperature: ---, 37°C; ○, 45°C; ●, 50°C; △, 55°C.

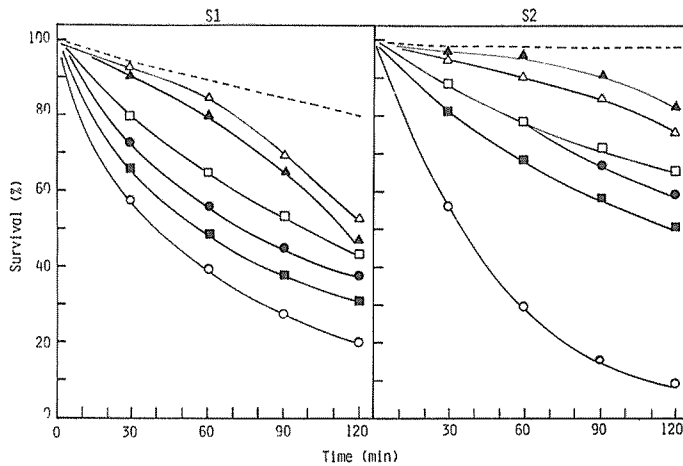


Fig. 2 pH stability of S-phages. Phages (2×10^8 PFU/ml) were incubated in nutrient broth at different pH values at 37°C. pH: ---, 7; ○, 4; ●, 5; △, 6; ▲, 8; □, 9; ■, 10.

ていった。特に酸性側でより不安定であった。

3 ファージの吸着

ファージの菌への吸着は、ファージ感染の最初の段階である。

ブイヨン培地における S 1 および S 2 ファージの吸着については既に報告している^{4,5,6)}。すなわち、S 1 ファージの吸着は速く、3 分間で 90% の吸着率であった。これに対して、S 2 ファージの吸着は遅く、5 分間で 30%、10 分間でも 35% であった。

4 ファージの吸着に及ぼす温度の影響

ファージの菌への吸着は、菌の生理状態、環境条件などによって影響される。特に、特定の陽イオンの適当な濃度が必要とされることが多い。更に、ファージによっては、L-トリプトファンのような補助因子が必要とされることもある。したがって、ファージ対策の一つとしてファー

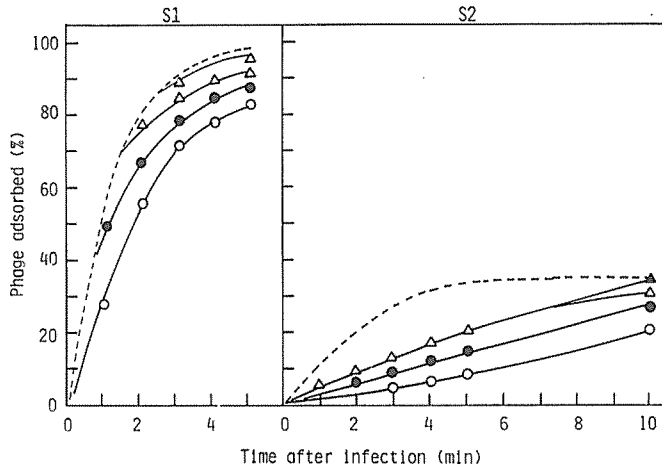


Fig. 3 Effect of temperature on adsorption of S-phages. Bacterial cells (2×10^8 /ml) were mixed with phage (m.o.i., ca. 1) in nutrient broth, and the mixtures were incubated at different temperatures. The unadsorbed phages were assayed by a 100-fold dilution of adsorption mixture, following by sedimentation of adsorbed phages by centrifugation. Temperature: ·····, 37°C; ○, 10°C; ●, 20°C; △, 30°C; ▲, 45°C.

ジの菌への吸着阻止を考える場合、ファージの吸着に影響する因子について検討する必要がある。また、前述したように、S2ファージでは吸着が遅いので、このファージの吸着に特定の金属イオンやアミノ酸などが必要とされることも考えられる。

まず、ファージの吸着に及ぼす温度の影響について検討した。

Fig. 3に、10°Cから45°Cの間で検討した結果を示す。S1およびS2ファージとも吸着速度は37°Cで最高であった。それより低温あるいは高温では、吸着速度が次第に低下した。

なお、図から明らかなように、吸着に及ぼす温度の影響は、吸着速度に対する影響なので、時間を長くすれば吸着率は次第に増加することになる。

5 ファージの吸着に及ぼす金属イオンの影響

I価およびII価の金属イオンの吸着に及ぼす影響について検討した。結果はTable 1に示す。II価のカルシウムとマグネシウ

Table 1 Effects of metal ions and amino acids on adsorption of S-phages

Addition	Concn. (M)	Phage adsorbed (%)	
		S1	S2
None	0	20~25	25~30
Ca ²⁺	1×10^{-4}	22	27~30
	1×10^{-3}	34~40	36~43
	1×10^{-2}	48~52	48~49
Mg ²⁺	1×10^{-4}	28~33	35~39
	1×10^{-3}	30~41	39~43
	1×10^{-2}	70	44~50
Na ⁺	1×10^{-3}	37~44	33
	1×10^{-2}	50	33~34
	1×10^{-1}	50~60	33~34
K ⁺	1×10^{-3}	22~27	32~33
	1×10^{-2}	28~34	36~38
	1×10^{-1}	56~61	36~39
L-Tryptophan	1×10^{-4}	28~30	36
	1×10^{-3}	34~36	45
	5×10^{-2}	42~46	45~49
L-Serine	1×10^{-4}	28~30	29~33
	1×10^{-3}	30~36	34~35
	1×10^{-2}	37~40	37

Bacterial cells were twice washed with 0.02M Tris-HCl buffer (pH7.4), and mixed with phage (m.o.i., ca. 1) in the buffer. A reagent was added just prior to adsorption, and the mixtures were incubated for 5 min.

ムは、濃度の増加につれて、S 1およびS 2ファージの吸着を次第に促進した。また、I 価のナトリウムとカリウムも濃度の増加につれて、両ファージの吸着を次第に促進した。しかし、S 2ファージの場合、促進の程度はわずかであった。

I 価の金属とII 価の金属との相違は、その有効濃度に違いがあることで、II 価の金属のほうがI 価の金属の1/10以下の濃度で同程度の促進効果を示した。

なお、S 1ファージの吸着率が95%でなく、20~25%であるのは、ブイオン培地中でなく、洗浄菌を使用して緩衝液中で吸着させたためである。

6 ファージの吸着に及ぼすアミノ酸の影響

S 1およびS 2ファージの宿主菌がアミノ酸のセリン生産菌であることから、アミノ酸であるトリプトファンとセリンの吸着に及ぼす影響について検討した。Table 1に示すように、トリプトファンとセリンは、両ファージの吸着を促進したが、その程度は著しいものではなかった。

7 ファージの増殖

ブイオン培地におけるS 1およびS 2ファージの増殖については、潜伏期は、S 1ファージで28分、S 2ファージで15分であった。バーストサイズは、S 1ファージで約450、S 2ファージでは約100であった。

8 ファージの増殖に及ぼす温度の影響

宿主菌に依存しているファージの増殖は、当然、その宿主菌の生理状態や環境条件などによって影響される。一般には、菌の生育の最適条件においてファージの増殖も最適である。

まず、S 1およびS 2ファージの増殖に及ぼす温度の影響について検討した。Fig. 4に37°Cより低い温度、Fig. 5に37°Cより高い温度の結果を示す。両ファージとも、37°Cにおいてファージの増殖は最適であった。

S 1ファージの場合、37°Cより低い温度では、温度の低下につれて潜伏期が次第に長くなるが、バーストサイズの減少はほとんどみられなかった。しかし、20°Cでは、バーストサイズの

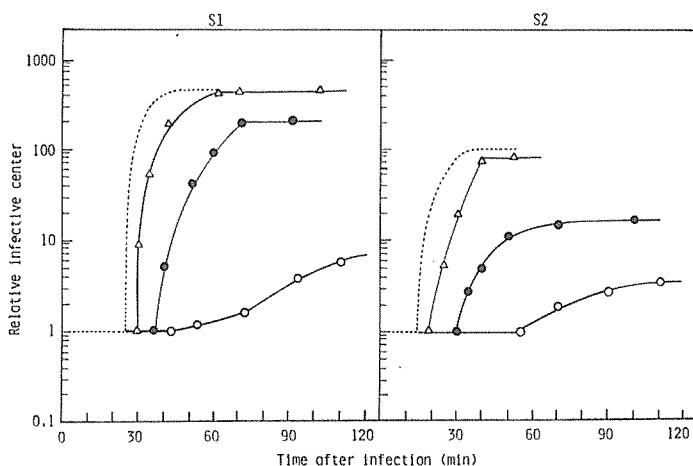


Fig. 4 Effect of low temperature on one-step growth of S-phages. Bacterial cells (2×10^8 /ml) were infected with phage (m.o.i., ca. 0.1). After 3 min of adsorption and 2 min of antiserum treatment, the infected cells were diluted 1:2000 into nutrient broth and incubated at different temperatures. The number of initial infected cells is represented as 1. Temperature: \cdots , 37°C; \circ , 20°C; \bullet , 25°C; \triangle , 30°C.

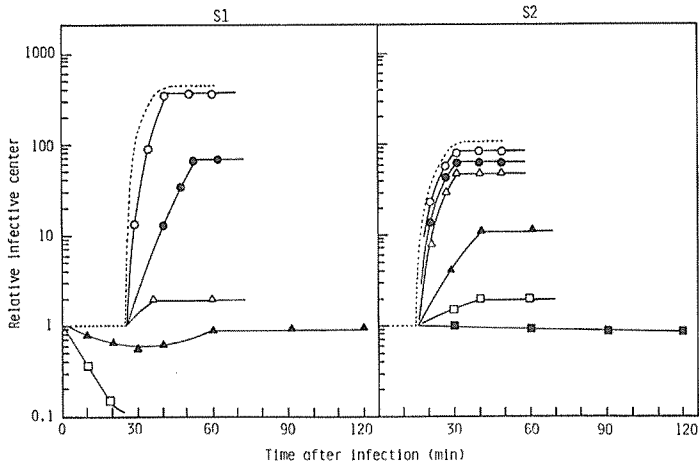


Fig. 5 Effect of high temperature on one-step growth of S-phages. See the legend to Fig. 4. Temperature: \cdots , 37°C; \circ , 40°C; \bullet , 42°C; \triangle , 43°C; \blacktriangle , 45°C; \square , 48°C; \blacksquare , 50°C.

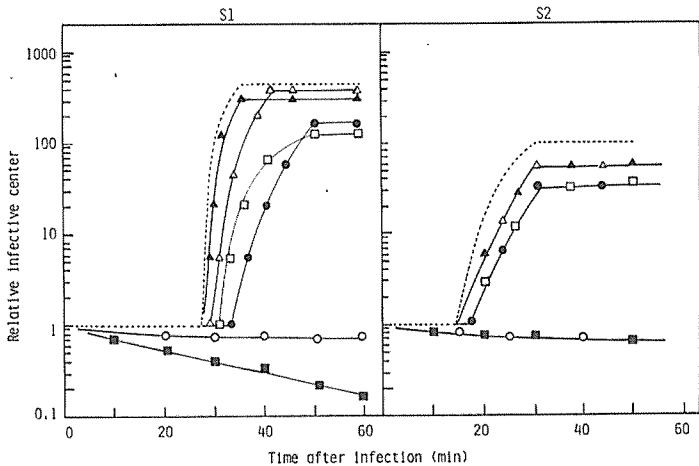


Fig. 6 Effect of pH on one-step growth of S-phages. See the legend to Fig. 4. pH: \cdots , 7; \circ , 4; \bullet , 5; \triangle , 6; \blacktriangle , 8; \square , 9; \blacksquare , 10.

減少が著しかった。一方、37°Cより高い温度では、潜伏期は変わらないが、温度の上昇につれてバーストサイズは次第に減少した。43°Cでは、バーストサイズが450から2と急激に減少した。45°Cでは、潜伏期の中に感染菌数の減少がみられ、また感染菌の一部によると考えられるファージのバーストもみられたが、全体としてはファージの増殖は抑えられた。48°Cでは、感染菌数の減少が著しかった。

S 2 ファージの場合、37°Cより低い温度では、温度の低下につれて潜伏期が次第に長くなり、バーストサイズも次第に減少した。37°Cより高い温度では、潜伏期は変わらず、温度の上昇につれてバーストサイズは次第に減少するが、S 1 ファージの場合と違って、48°Cまでファージのバーストがみられた。50°Cでは、感染菌数のゆるやかな減少がみられた。すなわち、S 2 ファージの増殖は、50°Cで完全に抑えられることが分かった。

9 ファージの増殖に及ぼす pH の影響

S 1 および S 2 ファージの増殖に及ぼす pH の影響について検討した。Fig. 6 にその結果を示す。両ファージとも、菌の生育の最適 pH である 7.0 でファージの増殖も最適であった。

S 1 ファージの場合、pH が酸性側あるいはアルカリ性側に移るにつれて、潜伏期が次第に延びてバーストサイズが次第に減少した。pH 4.0 以下および 10.0 以上では、ファージの増殖は起こらず、特に、pH 4.0 では感染菌数が次第に減少した。

S 2 ファージの場合、pH 6.0 および 8.0 では、潜伏期は変わらずバーストサイズが若干減少した。pH 5.0 および 9.0 では、潜伏期が少し延びてバーストサイズが更に減少した。pH 4.0 以下および 10.0 以上では、増殖はみられず、感染菌数はゆるやかに減少した。すなわち、S 1 ファージと比べ、pH 4.0, 6.0 および 8.0 における様相が多少相違することが分かった。

考 察

本研究は、ファージ防御策の一つとしてのファージの吸着および増殖の阻害という面から、S 1 および S 2 ファージの吸着および増殖に影響する因子について研究したものである。

まず、ファージの安定性とそれに及ぼす温度および pH の影響について検討した。37°C, pH 7.0 において、S 1 ファージは、S 2 ファージに比べ、比較的不安定であった。両ファージとも温度が高くなるにつれて次第に不安定になった。また、pH が酸性側あるいはアルカリ性側に移るにつれて次第に不安定になった。しかしながら、50°C までおよび pH 4.0~10.0 の範囲では、ファージの著しい不活化はみられず、温度および pH を変動させることによる遊離状態の S 1 および S 2 ファージの制御は、不可能であることが分かった。

次いで、ファージの吸着に及ぼす温度、金属イオンおよびアミノ酸の影響について検討した。温度については、37°C より低温あるいは高温では吸着速度が次第に低下したが、10°C までおよび 45°C までの範囲では大きい影響はみられなかった。I 価および II 価の金属イオン、アミノ酸のトリプトファンやセリンは、むしろ吸着を促進するものであった。このように、吸着を著しく阻害するものは見出せず、この面からのファージ制御は難しいことが分かった。

ファージの増殖に及ぼす pH の影響については、両ファージとも pH 4.0 および pH 10.0 で増殖が完全に阻害された。しかし、菌の増殖・発酵の最適 pH が中性付近であることを考えると、pH を著しく変動させることによるファージ制御は、実際的なものでない。

ファージの増殖に及ぼす 37°C より高い温度の影響は、ファージによって相違した。S 1 ファージの場合、43°C のバーストサイズは、37°C のときの約 0.4% であって、ファージの増殖はほぼ完全に阻害された。一方、菌の増殖は、43°C で 37°C よりも速いことが分かっている⁹⁾。すなわち、37°C より菌の生育が速い 43°C でファージの増殖がほぼ完全に抑えられるということであって、この発見の意味は大きい。通常の培養温度は 37°C であるが、仮に 43°C で菌を培養すれば、S 1 ファージが汚染してもその増殖はほとんど抑えられることから、ファージ汚染による被害をほとんど受けることなく、発酵が終了する可能性を示唆しているのである。

なお、S 2 ファージの場合、菌の生育できない 50°C においてファージの増殖が完全に阻害されるので、S 1 ファージのように温度を変動させることによるファージ制御はできない。

要 約

S 1 および S 2 ファージのブイオン培地 (37°C, pH 7.0) における安定性、吸着および増殖に

影響する若干の因子について検討し、次のことが分かった。

(1)温度安定性について、S 1 ファージは、S 2 ファージに比べ、より不安定である。(2) pH 安定性については、両ファージとも pH7.0が最も安定で、酸性側あるいはアルカリ性側に移るにつれて次第に不安定になる。(3)ファージの吸着に及ぼす温度の影響については、両ファージとも37°Cで最も吸着が速く、これより低温あるいは高温では吸着速度は次第に低下する。(4)金属イオンは、両ファージの吸着を促進する。(5)トリプトファンおよびセリンは、両ファージの吸着を促進する。(6)ファージ増殖に及ぼす温度の影響については、両ファージとも37°Cにおいて増殖が最適である。(7)S 1 ファージの場合、37°Cより低い温度では、潜伏期が次第に長くなるが、バーストサイズの減少はほとんどみられない。高い温度では、潜伏期は変わらないが、バーストサイズは次第に減少し、43°Cでは37°Cの約 0.4%にまで減少する。(8)S 2 ファージの場合、低温では潜伏期が次第に延び、バーストサイズは次第に減少する。高温では、潜伏期は変わらず、バーストサイズは次第に減少する。48°Cでも増殖阻害は完全でない。(9)ファージ増殖に及ぼす pH の影響については、両ファージとも pH7.0において増殖が最適である。酸性側あるいはアルカリ性側に移るにつれて、潜伏期が次第に延び、バーストサイズは次第に減少する。pH4.0および pH10.0では、ファージの増殖はみられない。

文 献

1. 本江元吉, 村田 晃, 緒方靖哉 (1970). "発酵と微生物", 植村定治郎, 相田 浩編, 朝倉書店, pp. 1-108.
2. Ogata, S. (1980). Bacteriophage contamination in industrial processes. *Biotechnol. Bioeng.* 22, Suppl. 1, 177-193.
3. Wünsche, L. (1989). Importance of bacteriophage in fermentation process. *Acta. Biotechnol.* 9, 395-419.
4. Wu, W.-W., Tanaka, K., Kato, F., and Murata, A. (1991). Phage S1, a new phage for *Escherichia coli*. *Bull. Fac. Agr. Saga Univ.*, 70, 91-100.
5. Wu, W.-W., Tanaka, K., Yoshinaga, K., Kato, F., Kanda K., and Murata, A. (1991). Isolation and characteristics of new phages from a serine producing *Escherichia coli* K-12. *J. Ferment. Bioeng.*, 71, 293-297.
6. Wu, W.-W., Yoshinaga, K., Kanda K., Kato, F., and Murata, A. (1991). Phage S2, another new phage for serine producing *Escherichia coli*. *Bull. Fac. Agr. Saga Univ.*, 71, 123-131.
7. Adams M. H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers, New York, pp. 443-552.
8. 梶偉巍 (1990). 遺伝子工学技法により造成されたL-セリン生産 *Escherichia coli* のファージ. 鹿児島大学大学院連合農学研究所博士論文, pp. 102-104.