

9030 細菌-ファージ系に対する食塩の作用

村田 晃(佐賀大学)

遺伝子組替え技術で造成した細菌を使用する有用物質生産が工業的スケールで始まっている。ところが最近、欧米諸国において、この細菌を侵すファージの汚染による有用物質生産の異常が報告され始め、わが国でもこの細菌を侵すファージの発生が認められるようになってきている。これは長年にわたって、細菌利用工業におけるファージ防御に関する研究が行われてきたにもかかわらず、いまだに一般的な防御対策法が確立されていないからである。応用微生物学・発酵学領域においてファージに関する研究は、重要な研究課題の一つであり、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。そこで、これまで知見のなかった食塩の細菌-ファージ系に対する作用を検討し、食塩を利用するファージ防御の可能性について研究した。

研究材料としては、*Escherichia coli* K-12 に組替え遺伝子を導入して造成したセリン生産菌とそのファージ(S1、S2)を用いた。

研究の結果、ファージの宿主菌に対する食塩の作用として、0.8 Mで菌の生育を完全に抑えることと、菌のコロニー形成単位を減少させることが分かった。コロニー形成能の喪失に対するベタインの影響について検討し、ベタイン添加によってコロニー形成能が回復することが分かった。したがって、食塩によるコロニー形成単位の減少は、殺菌的なものではなく静菌的なものであると考えられた。ファージに対する食塩の作用について、2 Mという高濃度でもファージを不活化しないことと、ファージの宿主菌への吸着を阻害しないことが分かった。食塩のファージ増殖に対する作用については、0.7 Mでファージの増殖を完全に抑えること、S1では感染中心数が減少するが、S2では減少しないこと、食塩によるファージ増殖抑制にベタインは影響を及ぼさないことが分かった。更に、食塩と温度の組合わせによるファージ増殖の抑制について検討した。S1の場合、37°Cから42°Cに上げると、より薄い濃度の食塩でファージ増殖が抑制された。S2の場合は、温度を上げてもファージ増殖抑制の食塩濃度は変わらなかった。

9030 細菌-ファージ系に対する食塩の作用

村田 晃(佐賀大学)

研究目的

遺伝子組換え技術で造成した細菌を使用する有用物質生産が工業的スケールで始まっている。ところが最近、欧米諸国において、この細菌を侵すファージの汚染による有用物質生産の異常が報告され始め、わが国でもこの細菌を侵すファージの発生が認められるようになってきている。これは長年にわたって、細菌利用工業におけるファージ防御に関する研究が行われてきたにもかかわらず、いまだに一般的な防御対策法が確立されていないからである。応用微生物学・発酵学領域においてファージに関する研究は、重要な研究課題の一つであり、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。そこで、これまで知見のなかった食塩の細菌-ファージ系に対する作用を検討し、食塩の適切な使用によるファージ防御の可能性について研究した。

更に、新しい考えとして、癌の温熱化学療法等にヒントを得たものであるが、食塩の共存下で比較的穏和な熱処理（細菌の加熱致死におけるアレニウスプロットを描いたときの屈曲点である約43℃を中心とした温度）を行ったときのファージの増殖阻害について検討した。

研究方法

1. 使用細菌 遺伝子工学技法によって造成したL-セリン生産 *Escherichia coli* K-12を使用した。
2. 使用ファージ L-セリン生産 *Escherichia coli* K-12の溶菌液から新しく分離したS 1およびS 2ファージを使用した。
3. 培地 通常のブイヨン培地を使用した。
4. 細菌及びファージの計数 重層法によるコロニーカウント法及びブランクカウント法によった。
5. その他 ファージに関する実験方法は Adamsがまとめた方法によった。

研究結果

1. 宿主菌に対する温度の影響

S 1およびS 2ファージの宿主菌である*Escherichia coli* K-12に対する温度の影響について、37℃より高い温度の影響を検討した。

Fig. 1 に、その結果を示す。図の左側に示すように、培養濁度(生育)からみて、41℃

ないし42℃が生育の最適温度であった。39℃と43℃でも、37℃より生育が速かった。一方、45℃以上では37℃より生育が遅くなり、50℃では生育が完全に阻害された。図の右側に示すように、コロニー形成単位に対する温度の影響も同様であって、41℃ないし42℃で増殖が最も速かった。他方、50℃ではコロニー形成単位が次第に減少し、菌の死滅が始まっていた。

2. ファージの増殖に対する温度の影響

37℃より高い温度におけるファージの増殖について検討した。Fig. 2 に、その結果を示す。

S 1 ファージの場合、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が次第に減少し、43℃では、37℃の約450に比べ2と著しく減少した。なお、45℃ではファージの増殖が完全に阻害された。

S 2 ファージの場合、43℃でのバーストサイズは、37℃での約100に比べ約40であって、ファージの増殖が完全に阻害される温度は、50℃であった。

3. 宿主菌に対する食塩の作用

*Escherichia coli*は、非好塩菌・非耐塩菌であって、生育に最適の食塩濃度は0.2M以下である。S 1 およびS 2 ファージの宿主菌である *Escherichia coli* K-12に対する食塩（塩化ナトリウム）の作用について検討した。

Fig. 3 に、37℃における食塩の作用を示す。図の左側に示すように、食塩を添加すると、濃度に応じて培養濁度が一時的に急上昇した。培養濁度（生育）に及ぼす食塩の作用は、0.2M付近から見られ始め、0.8Mでは生育が完全に阻害された。図の右側に示すように、0.6~1.0Mでは、コロニー形成単位が一度減少した後、20~90分後に増加し始めた。

4. ファージに対する食塩の作用

遊離状態にあるS 1 およびS 2 ファージに対する食塩の作用について検討した。その結果、食塩は、2Mという高濃度でもS 1 およびS 2 ファージに対して不活化作用を示さないことが分かった。

5. ファージの吸着に対する食塩の作用

S 1 およびS 2 ファージの宿主菌細胞 (*Escherichia coli* K-12) への吸着に対する食塩の作用について検討した。その結果、食塩は、2Mという高濃度でもS 1 およびS 2 ファージの宿主菌細胞への吸着を阻害しないことが分かった。

6. ファージの増殖に対する食塩の作用

S 1 およびS 2 ファージの増殖に対する食塩の作用について検討した。Fig. 4 にその結果を示す。

S 1 フェージの場合、食塩の濃度が高くなるにつれて潜伏期が次第に延長し、バーストサイズが次第に減少した。0.5、0.6Mでは、感染中心数が一度減少した後、上昇した。0.7Mおよびそれ以上の濃度では、フェージの増殖は完全に阻害された。このとき、感染中心数は減少するだけで上昇は見られなかった。

S 2 フェージの場合、S 1 フェージと同じような傾向であったが、違うところは、0.6 Mでもかなりバーストすることと、高濃度でも感染中心数の減少が見られないことであった。

7. 食塩によるコロニー形成能喪失に対するペタインの影響

Rothらは、*Escherichia coli* CA8000に対する高濃度食塩(0.8M)の作用について、食塩を作用させるとコロニー形成能が失われるが、ペタインを添加するとコロニー形成能が回復することから、食塩の作用は、殺菌的ではなく静菌的であると考えている。そこで、0.8M以上の高濃度食塩による *Escherichia coli* K-12 のコロニー形成能喪失に及ぼすペタインの影響について検討した。結果は Fig. 5 に示す。

0.8M食塩では、ペタインの影響は認められなかった。しかし、1 Mでは、ペタイン添加によってコロニー形成単位の増加の度が大きくなって、120分添加では最初の約20%にまで回復した。1.2Mでは、コロニー形成単位の増加は見られないのに、ペタイン添加によってコロニー形成単位数が増加し、120分添加では最初の約6%にまで回復した。

したがって、S 1 およびS 2 フェージの宿主菌である*Escherichia coli* K-12の場合も、*Escherichia coli* CA8000の場合と同様、高濃度食塩によるコロニー形成単位の減少は、殺菌的なものでなく静菌的なものであると考えられる。

8. 温度と食塩の組合せによるフェージ増殖の抑制

比較的穏和な熱処理と食塩の組合せによるフェージ増殖の抑制について検討した。

まず、Fig. 6 に、42℃における宿主菌の生育に対する食塩の作用を示す。菌の完全生育抑制は、37℃のとき0.8Mであったが、42℃に温度を上げると、0.7Mと食塩濃度が少し減少した。

Fig. 7 に、42℃におけるS 1 およびS 2 フェージの増殖に対する食塩の作用を示す。

S 1 フェージの場合、食塩の0.2、0.4Mで潜伏期は37℃のそれと変わらなかったが、バーストサイズは大幅に減少した。0.5Mでは、感染中心数が一度減少した後、上昇したが、バーストサイズは1以上にならず、全体としてフェージの増殖は抑えられた。0.6Mでは、感染中心数が次第に減少し、フェージの増殖は完全に抑えられた。すなわち、フェージ増殖の完全抑制は、37℃のときは0.7Mであったが、42℃に温度を上げることによって、0.6Mと食塩濃度が少し減少した。

S 2 フェージの場合、0.2-0.6Mで潜伏期は、37℃のそれと変わらなかったが、バーストサイズは次第に減少した。フェージの増殖は、0.5、0.6Mでほぼ完全に抑えられ、0.7 Mでは完全に抑えられた。この場合、フェージ増殖を完全に抑制する食塩濃度は、温度を

42℃に上げてても変わらなかった。

なお、43℃におけるS1およびS2ファージの増殖に対する食塩の作用については、S1ファージの場合、感染中心数は、0.2Mで一度減少した後上昇したが、バーストサイズは1以上にならず、全体としてファージの増殖は抑えられた。

S2ファージの場合、0.2~0.6Mでファージの増殖は完全に抑えられず、完全抑制には0.7Mが必要であって、37℃の場合と変わらなかった。

考察

新しいファージ制御を目指して、食塩によるファージの増殖阻害、食塩の共存下で比較的穏和な熱処理を行ったときのファージの増殖阻害について追究するために、高温の影響、食塩の作用、高温と食塩の組み合わせによるファージ制御に分けて検討した。

まず、37℃より高い温度の宿主菌に対する影響について検討した。その結果、41℃ないし42℃で菌の生育速度が最も速いことが分かった。更に高温では生育速度が低下し始めたが、43℃では37℃のそれより速かった。45℃以上では37℃より生育が遅くなり、50℃では生育が完全に抑えられた。

ファージの増殖に対する高温の影響は、ファージによって相違した。S1ファージの場合、43℃のバーストサイズは、37℃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。すなわち、37℃より菌の生育が速い43℃でファージの増殖はほぼ完全に抑えらえるということで、この発見の意味は大きい。通常の培養温度は37℃であるが、仮に43℃で菌を培養すれば、S1ファージが汚染してもその増殖はほとんど抑えらえることから、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。

S2ファージの場合は、50℃においてファージの増殖が完全に阻害された。

次いで、食塩の宿主菌およびS1、S2ファージの増殖に対する作用について検討した。

食塩の宿主菌に対する作用については、特徴的なこととして、食塩を添加すると培養濁度が一時的に急上昇することがあった。この間、総菌数に変動は見られなかったので、この培養濁度の上昇は、浸透圧の急変による菌細胞の一時的膨大によると考えられる。0.6~1.0Mでは、コロニー形成単位が一度減少した後、20~90分後に増加し始めた。これは食塩に対する生理的適応によって菌の生育が遅れて始まるためと考えられる。

食塩によるコロニー形成能喪失に対するペタインの影響については、1.2M食塩によって失われたコロニー形成能がペタインによって回復することから、高濃度食塩によるコロニー形成能の喪失は、殺菌的なものではなく静菌的なものであると考えられる。

Rothらの *Escherichia coli* CA8000と比べると、*Escherichia coli* K-12は、生理的適応が早くて大きいといえる。また、耐塩性がより強いということもいえる。したがって、0.8Mではペタインの効果が表われず、1M以上で表われたと考えられる。

37℃のとき、*Escherichia coli* K-12の生育が0.8M食塩で阻害された。他方、食塩に

よってS1およびS2ファージの増殖も阻害された。しかし、ファージ増殖の完全阻害は、宿主菌の生育が完全に抑えられる0.7M以上においてであり、ファージ増殖阻害と宿主菌生育阻害との間に選択的な濃度差はほとんど認められなかった。したがって、37℃においては使い方について工夫しない限り、食塩を用いるファージの制御は、実用上の価値がほとんどないと考えられる。

そこで、高温と食塩の組合せによるファージ増殖の抑制について検討した。

宿主菌の生育は、37℃のとき食塩の0.8Mで完全に抑制されたが、42℃に温度を上げると食塩の濃度が0.7Mと少し減少した。ファージ増殖に対する食塩の作用は、S1ファージの場合、ファージ増殖の完全抑制は、37℃のとき0.7Mであったが、42℃に温度を上げることによって0.6Mと食塩濃度が少し減少した。更に、43℃に上げると、0.2Mと食塩濃度が著しく減少した。

他方、S2ファージの場合、温度を上げても食塩濃度が減少することはなかった。

この結果、ファージによっては、温度を上げることによって、より薄い濃度の食塩でファージの増殖を抑えることができることが分かった。すなわち、温度を上げることによって、ファージの増殖阻害と宿主菌生育阻害との間の選択的な濃度差を大きくすることが示された。食塩の共存下で比較的穏和な熱処理方法を行うこの方法は、更に使い方を工夫することによって、実用化できる可能性があると期待される。

今後の課題

食塩の使用によるファージ防御について、その可能性が示されたので、食塩の適切な使い方を工夫する必要がある。

また、検討した細菌-ファージ系が *Escherichia coli* とそのS1及びS2ファージだけなので、これ以外の多数の細菌-ファージ系について検討し、食塩の作用の一般性、普遍性あるいは特異性を明らかにする必要がある。

更に、食塩のファージ増殖阻害作用の機構等に関する生化学的研究を進める必要がある。

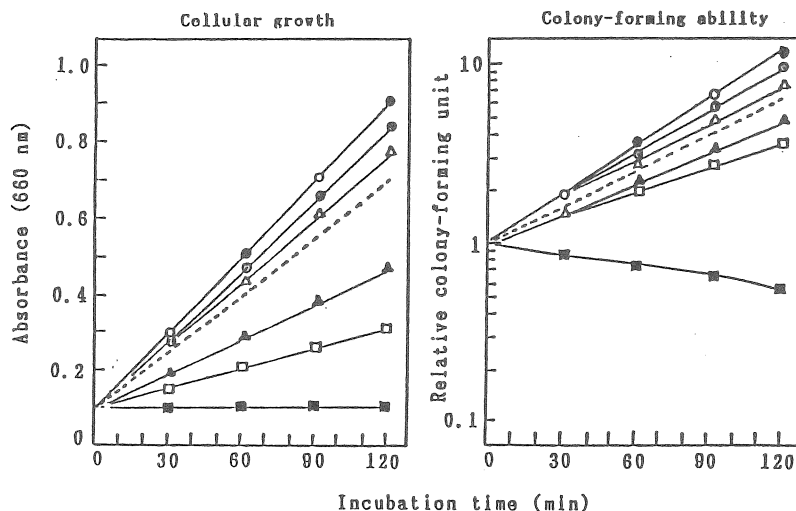


Fig. 1. Effects of high temperature on cellular growth and colony-forming ability of *Escherichia coli* K-12.

Bacteria (2×10^8 cells/ml) were incubated in nutrient broth at different temperatures. Temperature : \cdots , 37°C; \odot , 39°C; \circ , 41°C; \bullet , 42°C; Δ , 43°C; \blacktriangle , 45°C; \square , 47°C; \blacksquare , 50°C.

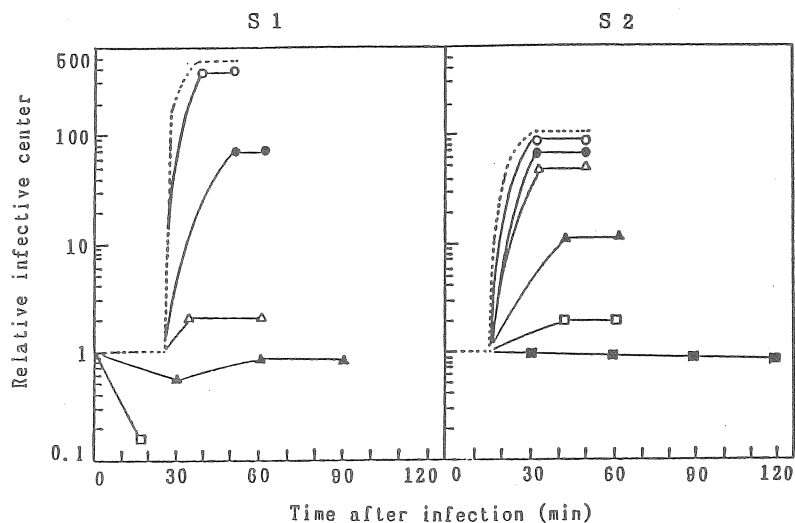


Fig. 2. Effects of high temperature on one-step growth of S-phages.

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 37°C. The number of initial infected cells is represented as 1. Temperature : \cdots , 37°C; \circ , 40°C; \bullet , 42°C; Δ , 43°C; \blacktriangle , 45°C; \square , 48°C; \blacksquare , 50°C.

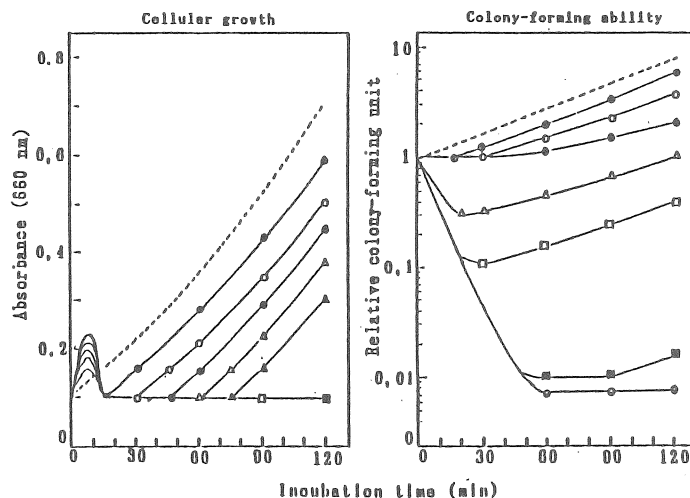


Fig. 3. Effects of sodium chloride on cellular growth and colony-forming ability of *Escherichia coli* K-12.

Bacterial cells (2×10^8 /ml) were incubated in nutrient broth with NaCl at 37°C. The initial number of cells is represented as 1. Concentrations of NaCl (M) : ----, 0; ○, 0.2; ○, 0.3; ●, 0.4; △, 0.6; ▲, 0.7; □, 0.8; ■, 1.0. ⊖, 1.2.

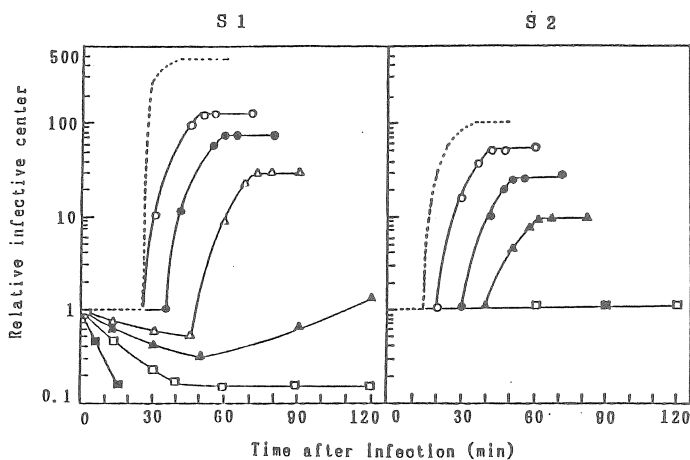


Fig. 4. Effects of sodium chloride on one-step growth of S-phages.

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 with NaCl and incubated at 37°C. The number of initial infected cells is represented as 1. Concentrations of NaCl (M) : ----, 0; ○, 0.2; ●, 0.4; △, 0.5; ▲, 0.6; □, 0.7; ■, 1.0.

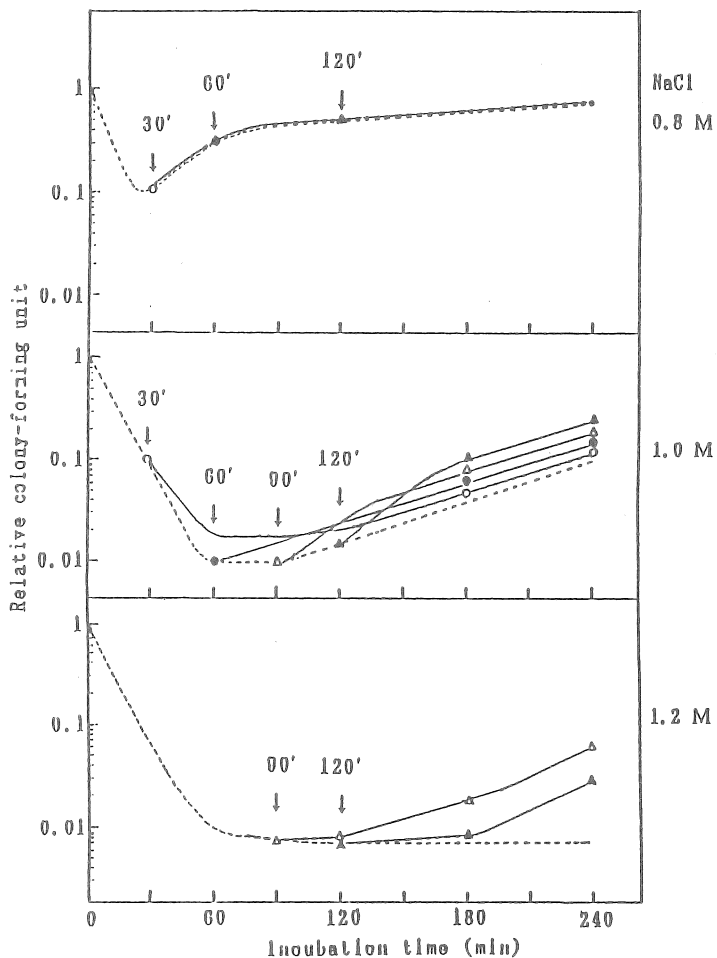


Fig. 5. Loss of colony-forming ability and restoration by betaine in sodium chloride-upshocked culture of *Escherichia coli* K-12.

Bacteria (2×10^9 cells/ml) were incubated in nutrient broth at 37°C and NaCl was added at time zero. The initial number of cells is represented as 1. The arrows show the time of betaine addition (2 mM). ----, no betaine addition.

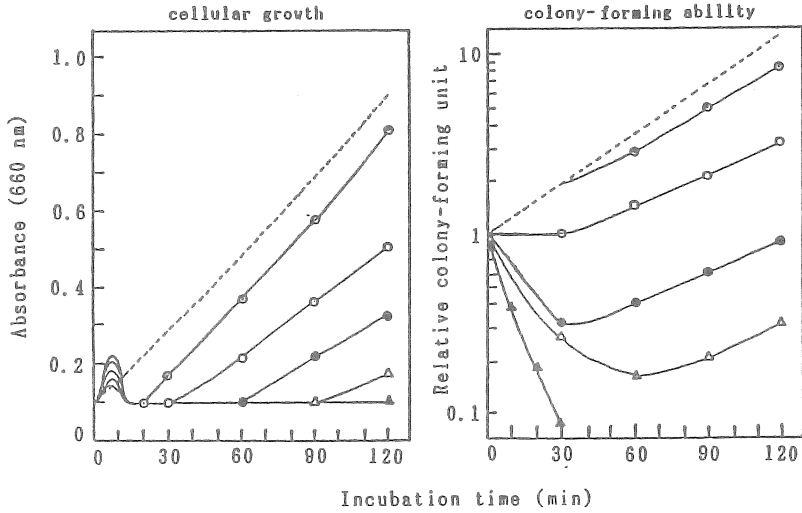


Fig. 6. Cellular growth and colony-forming ability of *Escherichiacoli* K-12 at 42°C.

See legend to Fig. 3, but incubated at 42°C instead of 37°C.

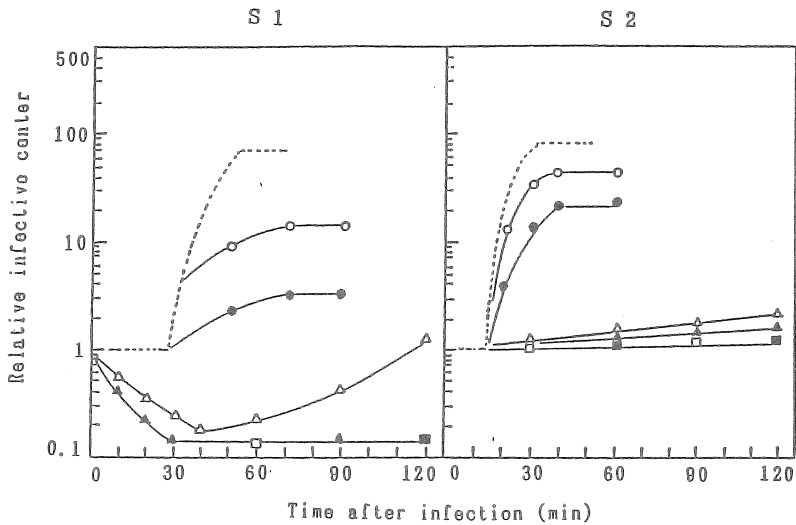


Fig. 7. Effects of sodium chloride on one-step growth of S-phages at 42°C.

See the legend to Fig. 4.

Effect of salt on bacteria-phage system

Akira Murata

Wei-Wei Wu, Fumio Kato and Kozo Kanda
Department of Applied Biological Sciences,
Saga University

Phage contamination is a serious problem in industrial fermentation processes employing bacteria. This problem has not been solved yet, although much work has been done. With the recent development of recombinant DNA technology, genetically modified bacteria have been increasingly employed for the large-scale production of useful substances. Studies on the prevention of phage contamination and the control of phages in industrial processes are currently of importance.

We isolated two new phages from culture lysates of a genetically modified serine-producing Escherichia coli K-12 and designated S1 and S2.

Effect of salt on phage has not been studied yet in relation to phage control. Therefore, we investigated the effects of salt on phages and their host bacteria, using phages S1 and S2 and Escherichia coli K-12.

Salt completely inhibited the growth of bacterial cells at 0.8 M and more. Under these concentrations, colony-forming activity of cells decreased. This loss of colony-forming activity was not the results of cell death, because the colony-forming ability was restored after treatment with betaine. Salt did not affect the infectivity of free phage and the adsorption of phage onto cells. Salt completely inhibited the growth of phages at 0.7 M and more. The number of infective center decreased with phage S1, but not with phage S2. Since salt exhibited little selective action in this system, it cannot be used in the conventional manner when fermenting culture is infected with phage.

Then, the combination effect of salt and higher temperature on the growth of phages and their host bacterial cells was investigated. At 42°C lower concentrations of salt inhibited the phage growth and decreased the number of infective center with phage S1. However, with phage S2 this was not true.