

アミラーゼ生産菌のバクテリオファージおよびデオキシリボヌクレアーゼに関する研究(第5報)ファージ感染菌のデオキシリボヌクレアーゼ・リボヌクレアーゼ及びプロテアーゼ

渡辺, 健治
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21563>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 19 (1), pp.59-66, 1961-11. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

アミラーゼ生産菌のバクテリオファージ およびデオキシリボヌクレアーゼに 関する研究 (第5報)

ファージ感染菌のデオキシリボヌクレアーゼ・
リボヌクレアーゼ及びプロテアーゼ

渡 辺 健 治

Studies on the bacteriophage and desoxyribonuclease
of a *Bacillus subtilis* strain producing amylase (Part 5)

The DNase, RNase and protease activity
of phage infected bacterium

Kenji Watanabe

緒 言

バクテリオファージの増殖やファージ感染細胞の代謝についての研究は、一般にウイルス増殖の生化学的研究のモデルとして種々の点で好適であるが、このため主として *Escherichia coli* の T₂ファージ系が広く用いられてきている。

即ち、感受性細菌にファージが感染しファージ DNA の注入が起こると宿主細菌固有の代謝系が宿主細菌とファージとの複合体の代謝系に切り替えられ、ここで新しく注入された DNA と同じ特異性をもつ子ファージの合成が始まる。上記 *E. coli* の T 系偶数ファージの DNA は普通の DNA と異つてその分子中に cytosine がなく、代りにその誘導体である 5-hydroxymethylcytosine (HMC) が含まれているので、この特有な塩基即ち HMC を標識としてファージ DNA の合成に関与する酵素系、例えば desoxycytidimonophosphate-hydroxymethylase^{3,4)} 等を中心にして多くの研究がなされてきた。

一方 Pardee *et al.*⁹⁾ は前記 T₂ ファージを用いてファージ感染菌の種々の酵素活性を調べファージ感染で *E. coli* の菌体内 DNase 活性の増加することを認めた。著者はさきに分離した *B. subtilis* 系細菌のファージ¹⁰⁾を用いてウイルス増殖の生化学的解析を行なつてきているが、多角体ウイルスについて吉原氏¹¹⁾が報告したと同様にファージ感染細胞の desoxyribonuclease (以下 DNase と略す)に着目し、その活性の動向について検討を加えた。なお対照として菌体内 ribonuclease (以下 RNase と略す)及び protease の活性を調べた。

実験材料及び方法

1. 使用菌株、ファージ及び培養法

宿主菌である *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto-K49⁹⁾及びそのファージ株

は前報¹⁰⁾記載のものであつて、数年来当教室に冷暗所で保存しているものである。菌体の通常の培養には MI 培地を用いて 30°C で振盪培養した。

Protoplast 系におけるファージ増殖実験の場合、0.5 M-sucrose 含有 MI/2 培地を U-ボートに入れて使用した。

ファージ感染菌の代謝を調べる場合に使用する ファージは超遠心分離機で濃縮して用いた。またファージ濃度は常法の平面培養法で溶菌斑を計数して測定した。

2. 供試試薬

リゾチーム：Alderton *et al.* の方法¹⁾で卵白より調製した等電点結晶リゾチームで4回再結、透析後凍結乾燥して保存した。

カゼイン：メルク製 (Kasein nach Hammerstein)。稀アルカリに溶かし、pH 7.5~8 に調整して使用した。

RNA：ミノファーゲン製酵母 RNA を稀アルカリで中和して使用した。

TCA試薬：三塩化醋酸 2.04 g, 醋酸ソーダ 3.40 g, 氷醋酸 2.1 ml を水に溶かして 100 ml にする。

ウラニル試薬：醋酸ウラニウムが 0.75 % になる如く含まれる 25 % 過クロール酸水溶液。

3. 供試酵素液の調製

振盪培養菌を遠沈後、生理食塩水で洗浄してから蒸留水に懸濁し 15 分間音波処理 (久保田 10 KC 型強力音波発生装置) して菌体を破壊し、これを冷凍遠心分離 (5000 r.p.m., 10 分) して得た無細胞菌体抽出液を供試酵素液とした。

酵素液中の蛋白濃度は Lowry *et al.*²⁾ の銅-Folin 変法に従つて定量した。

4. 酵素活性の測定法

Protease：カゼインを基質とする萩原氏³⁾の Folin 変法に従い定量した。即ち 2% カゼイン 1 ml, Atkins-Pantin の M/5 炭酸-硼酸緩衝液 (pH 8.0) 1 ml, 及び酵素液 (菌体無細胞抽出液を水で 2 倍に稀釈) 1 ml を反応液とし 37°C でインキュベートさせた。適時に TCA 試薬 2 ml を加え反応を止め、そのまま 20 分間氷冷して未反応蛋白質を沈澱させた。つぎに軽く遠沈し、さらに濾紙を用いて自然濾過した無色透明の濾液 1 ml に 0.4 M 炭酸ソーダ 5 ml, フェノール試薬 1 ml を加えた。これを 35°C で 20 分間放置し、生じた青色をフィルター Red (日立光電比色計 TK-120S 型) を通し、吸光度 ($-\log T$) を測定しブランクとの差で各の測定値を表わした。ブランクとしては酵素液を沸騰水中に 10 分間浸漬したものをを用いた。

RNase：反応液の組成は 0.2 M-Tris 緩衝液 (pH 7.6) 1 ml, RNA (7.3 mg/ml) 0.5 ml, 0.02 M-EDTA 0.3 ml, 酵素液 0.5 ml, 水 0.7 ml, 計 3 ml であつて 37°C で 1~2 時間反応させた。ウラニル試薬 0.5 ml を加えて反応を止め 30 分間氷冷後、遠心分離して得られる無色透明の上清を水で 10 倍に稀釈しその 260 m μ での吸光度 ($-\log T$) を日立分光光度計 (EPU-2 A型) を用いて測定した。ブランクは酵素液を入れずに一定時間放置後、ウラニル試薬で反応をとめてから酵素液を加えたものをを用いた。この条件下で吸光度 (RNA の分解率に比例) は第 1 図に示される如く酵素濃度に直線的に比例した。

DNase：前報¹⁰⁾と同じく牛脾臓より調製した DNA のナトリウム塩を基質とし pH 8.5

で反応させ、反応液の酵素作用による粘度低下をオストワルド型粘度計で測定する方法と、反応液の PCA 可溶上澄の紫外部 (260 m μ) 吸収の増加を分光光度計で測定する方法を併用した。

実験結果

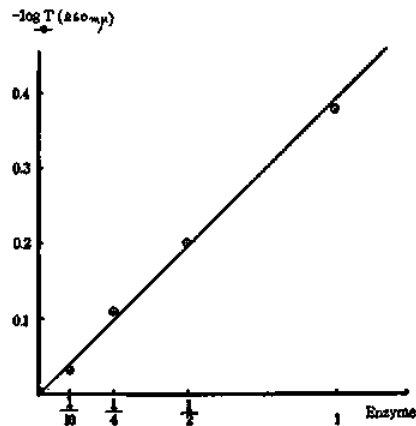
1. ファージ感染菌の DNase, RNase, protease.

宿主菌である K49 菌の 20 時間培養 50 ml を 250 ml の新鮮な中性 MI 培地に植え継ぎ、30°C で 3 時間さらに振盪培養を続ける。かくして得られたいわゆる更新培養 (rejuvenated culture) に高重度感染となる如く 10^{9-10} 個/ml 濃度のファージ液 50 ml を作用させ中性で反応を開始させた。反応は縮検した 500 ml 容量の坂口コルベンを用い人工的に振盪しながら 37°C の水浴中で行なつた。一定時間毎に反応液から 30 ml 採取、直ちに氷冷して反応をとめその中の 0.5 ml で plaque count してファージ数を測定し、残り 29.5 ml は冷凍遠心しさらに沈渣を生理食塩水で洗浄後 5 ml の蒸溜水に懸濁し、音波処理して遠沈、その上澄液を酵素液とした。粘度法による DNase の測定は常にその日の中に行なつたが、その他は遠沈上澄を冷蔵庫 (0~4°C) に一夜保存し翌日酵素活性を測定した。

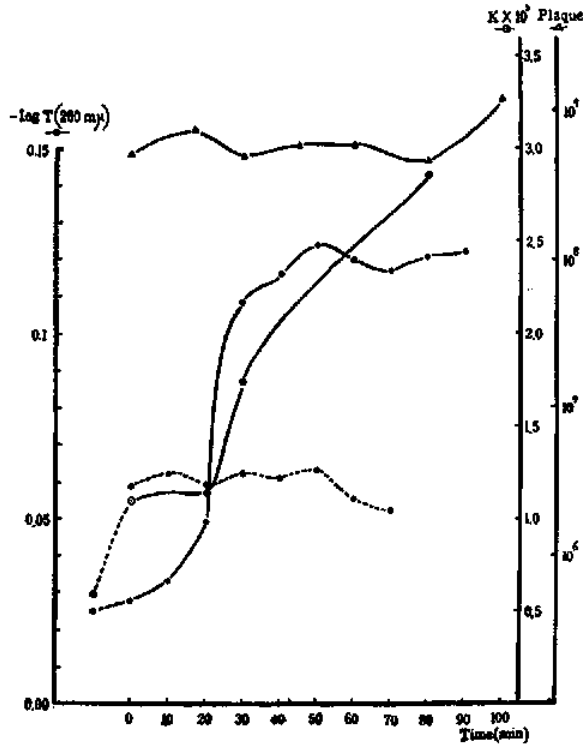
第2図-Aはファージ感染による DNase 及び plaque 数の変化を示したものであり、横軸は感染後の時間 (分)、縦軸は DNase 活性及び plaque 数である。DNase 活性の測定には粘度法、紫外法の両方を用いたがそれぞれ蛋白質 100 γ あたりの $K \times 10^3$, $-\log T (260 m\mu)$ で表示した。また plaque 数は対数スケールで示した。

図から明らかな如くファージ感染で宿主菌体内 DNase は粘度法でも紫外法でもファージ増殖の潜伏期に増加し始め、零時間における活性の数倍に達する。ファージの成長曲線は培養液の pH, 温度, 宿主菌の成育年令により変化を受けることはすでに報告したが、その他に菌体やファージ数の絶対量, 好気性菌においては好気性の程度, 培養容器の大きさ等種々の因子の影響をうけるものである。本条件ではファージ成育の潜伏期は 80~90 分で最適条件より延長されているが、この時期にすでに DNase の活性増加が認められるのである。図中点線 (.....) は別の実験でファージ液の対照として濃縮溶菌液の代わりに中性 MI 培地 50 ml を rejuvenated culture に加えた時の DNase 活性の消長を紫外法で追求めたものであつて予想通り活性の変化は認められなかつた。

第2図-Bは同じ酵素液を用いて RNase 及び protease 活性を調べたもので図の混乱を避けるために、別図として示した。点線は同じくファージ溶菌液の代わりに中性 MI 培地を用



第1図. RNase による反応液の吸光度の増加と酵素量との関係。
横軸：無細胞菌体抽出液の濃度を 1 とした酵素の相対量
縦軸：260 m μ での吸光度の増加。酵素液の代わりに水を用いた区分を標準とした。
反応条件：37°C, 2 時間。



第2図-A. ファージ感染後の菌体内 DNase 活性及び plaque 数の時間との関係。

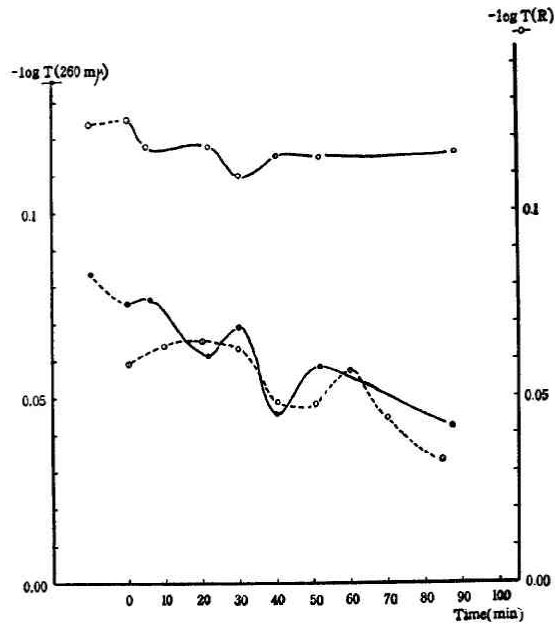
- : DNase 粘度法 ($K \times 10^3$) 零分前の値はファージ感染前の活性。
- : DNase 紫外法 ($-\log T$) 零分前の値はファージ感染前の活性。
- : DNase 紫外法 ($-\log T$) コントロール。
- △—: plaque 数 対数スケールで表示。

いた時の対照実験である。図から明らかな如くファージ感染により RNase, protease の活性は本実験条件では増加しなかつた。RNase はむしろやや活性減少の傾向にあつた。

2. ファージ感染と DNase の活性化との関係

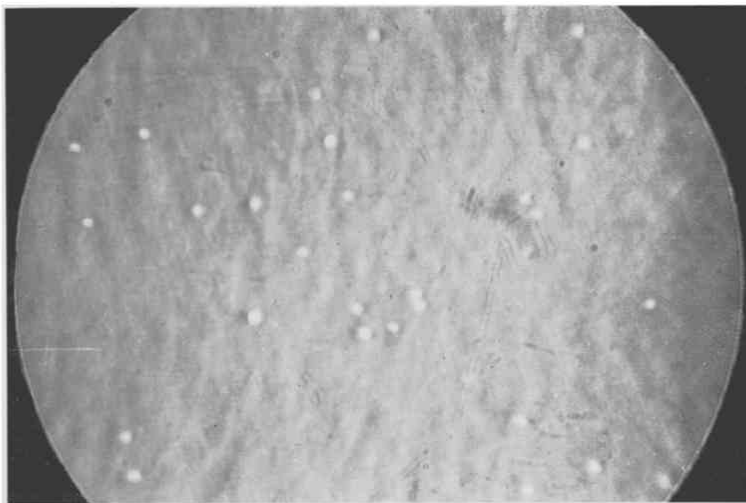
ファージ感染菌における菌体内 DNase の活性化がファージ増殖に必須か否か、またそれはいかなる役割をもっているかを検討するためまず DNase 阻害剤共存反応液中でのファージ増殖の有無を前報¹⁰⁾の protoplast 系を用いて試験した。即ち増殖期の菌体にファージを 10 分間吸着させ遠沈洗浄した後、0.5 M-sucrose 含有 M/20 リン酸緩衝液 (pH 7.1) 中でリゾチーム処理して菌体を球状の protoplast に変え、第4図説明文の a, b, c, d の如き中性反応液を含む増殖管に移し 37°C で反応を開始させた。以後一段増殖実験の手技に従つて一定時間ごとに plaque count し新生ファージの生育を観察した。第3図は宿主 K49 菌 protoplast の位相差顕微鏡写真で、第4図は protoplast 系でのファージ増殖曲線である。

第4図中 protoplast (C) は阻害剤無添加の protoplast 系でのファージ増殖曲線であ

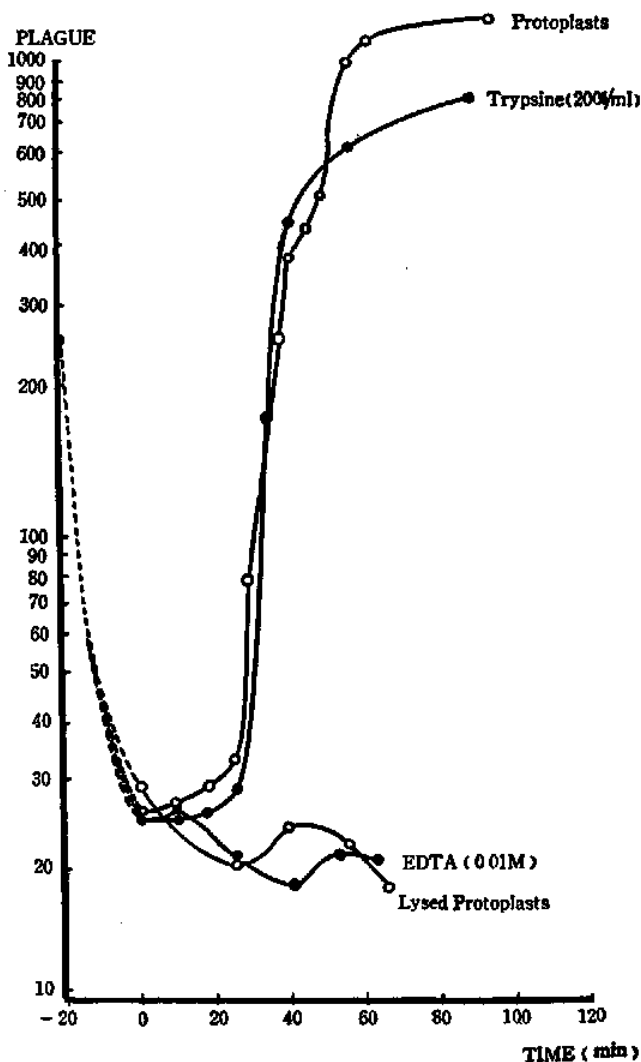


第2図-B. ファージ感染後の RNase, protease 活性と時間との関係.

- : RNase 紫外法 ($-\log T$) 零分前の値はファージ感染前の活性.
 - : protease Folin法 ($-\log T(R)$) 零分前の値はファージ感染前の活性.
 - …○… : protease Folin 法 ($-\log T(R)$) コントロール.
- 図中 (AB 共) 実線と点線は別々の酵素剤による実験



第3図. *B. subtilis* var. *amyloliquifaciens* Fukumoto K49 の protoplast. 位相差顕微鏡写真, 倍率任意.



第4図. 種々の条件下の protoplast 系におけるファージの増殖曲線.

横軸は protoplast に転換後反応を開始させてからの時間(分). 縦軸は plaque 数(対数スケール).

- | | | |
|--------------------------------|----------------|---------|
| (a) EDTA (0.01M) | Sucrose (0.5M) | M1/2 培地 |
| (b) trypsin (200 γ /ml) | Sucrose (0.5M) | M1/2 培地 |
| (c) | Sucrose (0.5M) | M1/2 培地 |
| (d) | | M1/2 培地 |

つて阻害剤影響実験の対照である. この場合リゾチーム処理で最初その感染中心価は10分の1以下に減少するが, やがて30分くらいしてから徐々に増加し始め結局最初の数倍の新生ファージを放出した. Lysed protoplast (d) は protoplast を sucrose を含まない反応液で急激に稀釈し滲透圧ショックでその球状構造を破壊したところの protoplast に

対する対照であつて、予期した如く最初その感染中心価が落ちたまま以後新生ファージの生成は全く認められなかつた。protoplastの構造破壊を目的として反応液に trypsin (最終 200r/ml, 市販品) を添加したが (b) 新生ファージは最初添加したファージの3~4倍に増加しその阻害効果は明らかでなかつた。これは trypsin と protoplast の接触時間が短かつた事、培地中に種々の蛋白質の存在していること等も原因しており、これから阻害力を判定することは出来ない。これに反して DNase 阻害剤である EDTA (最終 0.01M) が存在すると (a) ファージ増殖は Lysed protoplast と同じく全く認められなかつた。

考 察

細菌の分泌する酵素についての研究は工業的有用性等のために少なくないのであるが、菌体内の酵素はあまり取り扱われていない。本実験に使用した *B. subtilis* var *amyloliquefaciens* Fukumoto K49 の場合も同じであつてほとんど培養濾液の諸酵素が広く研究されており、代謝研究に重要である菌体内 DNase, RNase 及び protease についての報告はほとんどない。この点最近 Nishimura *et al.*⁹⁾ が細菌体内 RNase を分離精製したことは注目すべきである。この RNase は他と異なつて EDTA ではむしろ阻害され、また反応の最適 pH は 5.8 付近であると云われる。

前述の如く *E. coli* の T₂ ファージについては Pardee *et al.* の実験によりファージ感染で宿主菌体内の DNase 活性は約 1.5 倍に増加するが、著者の *B. subtilis*-ファージ系では感染で最初の数倍の DNase 活性の増加が認められた。これはファージ感染で今迄おさえられていた菌体内 DNase の作用が活潑になつたのであつて、この DNase は細菌やファージ DNA の分解に利用されるものと思われる。さらには Pardee *et al.* が述べている如く nucleotide の再編制、再結合等にも使われるのかも知れないが、断言は出来ない。

Zahn¹⁰⁾ は肝臓、骨髄の regeneration で DNase 活性の増加すると言う Brody¹¹⁾ の実験及びこれらの考えをもとにした彼の実験——即ち *Micrococcus*, 酵母, *Euglena gracilis*, ウニ等の組織培養は 10⁻⁶~5g/ml の DNase にさらすと細胞分裂速度が増す——から DNase は細胞の有糸分裂の速度をあげる一種の growth substance であるとの考えを提出している。

ファージ感染菌における DNase の活性化をファージ増殖に結びつける直接の証明法は見出せないのでまず protoplast 系を用い DNase 阻害剤共存中でファージ増殖が起こるか否かを試験した。比較に用いた trypsin の影響ははつきりしなかつたが DNase 阻害剤である EDTA が存在するとファージ増殖は全くおさえられた。また別の同じような実験で呼吸阻害剤である KCN (M/1000) は反応にほとんど影響しなかつた。これらの事実から DNase 活性がおさえられたためにファージの増殖がなくなつたように見えるが EDTA は Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ の如き金属のキレーターであつて DNase のみに特異的な阻害剤ではないのでこれだけでファージ増殖に DNase の活性化が必須だとは断言出来ない。しかし役割の程度はともあれ大体初期反応になんらかの仕方で関与しているものと推察される。

要 約

B. subtilis var. *amyloliquefaciens* Fukumoto-K49 のファージ感染による諸酵素活性の変動を菌体の音波処理無細胞抽出液を用いて調べた。その結果ファージ感染により宿主細菌の菌体内 DNase の活性は増加したが RNase, protease の変化ははつきりしなかつた。Protoplast 系でファージ増殖を行わせた場合 DNase 阻害剤の EDTA (0.01M) が存在するとファージの産生は全くおさえられた。以上の事柄より DNase の活性化とファージの感染、増殖との関係を推論した。

終りに本研究につき終始懇篤な御指導を賜つた本学山藤一雄教授に深甚な感謝の意を表するとともに貴重な菌株を御恵与いただいた大阪市立大学理学部福本寿一郎教授に厚く御礼申し上げます。なお、また顕微鏡写真作成の労にあたられた殿川道夫氏、実験に協力された横手保治君に感謝します。

文 献

1. Alderton, G. and H. L. Fevold, 1946. J. Biol. Chem., **164** : 1.
2. Brody, S., 1958. Nature, **182** : 1386.
3. Flaks, J. G. and S. S. Cohen, 1959. J. Biol. Chem., **234** : 1501.
4. Flaks, J. G., J. Lichtenstein, and S. S. Cohen, 1959. J. Biol. Chem., **234** : 1507.
5. 福本寿一郎, 1945. 農化, **19** : 487.
6. 萩原文二, 1953. 標準生化学実験法 (江上不二夫他編, 文光堂, 東京) p. 207.
7. Lowry, O. H. and N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall, 1951. J. Biol. Chem., **193** : 265.
8. Nishimura, S. and B. Maruo, 1960. Biochim. Biophys. Acta, **40** : 355.
9. Pardee, A. B. and I. Williams, 1952. Arch. Biochem. Biophys., **40** : 222. R. E. Kunkee and A. B. Pardee, 1956. Biochim. Biophys. Acta, **19** : 236.
10. Watanabe, K. and K. Yamafuji, Enzymologia, in press.
11. 吉原典子, 1959. 九大農芸誌, **17** : 241.
12. Zahn, R. K., 1960. Biochem. J., **76** : 66.

Summary

Variations in the various enzyme activities (DNase, RNase and protease) of the phage infected bacterium, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto K 49, were investigated. The extract prepared by sonic oscillation was used to assay these enzyme activities.

There was a considerable increase in DNase activity upon infection of this bacterium with bacteriophage. On the other hand, RNase and protease showed at most small change upon infection.

In a protoplast system normal phage production was not observed when EDTA, DNase inhibitor, of a concentration of 0.01 M existed in the medium. Accordingly it was surmised that the activation of DNase must have some relation with phage infection and its growth.