アミラーゼ生産菌Bac. subtilis var. amyloliquefaciens FUKUMOTO K49のバクテリオファージの変異株について

小島, 吉男
日本農薬株式会社

桑畑, 克彦
山陽パルプ株式会社

大村, 浩久
九州大学農学部食糧化学教室

https://doi.org/10.15017/23024

出版情報：九州大學農學部學藝雑誌. 23 (4), pp.7-12, 1968-09. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

アミラーゼ生産菌 *Bac. subtilis* var. *amyloliquefaciens* FUKUMOTO K 49 のバクテリオファージの変異株について

小島吉男*・桑畑克彦†・大村浩久

On mutants of bacteriophage of amylase-producing bacteria, *Bac. subtilis* var. *amyloliquefaciens* FUKUMOTO K 49

Yoshio Kojima, Katsuhiko Kuwahata and Hirohisa Omura

代表的なアミラーゼ生産菌である *Bac. subtilis* var. *amyloliquefaciens* FUKUMOTO K 49 いわゆる福本菌をおかすバクテリオファージF株については，我々の研究室において渡辺[3~8]によつて詳細に研究されその性質は明らかにされてきた．このファージは周囲に暈輪（ハロー）をもつ直径1～2 mmの透明な円型のプラークを生ずるものであつて最適条件（中性，37°C，MI 培地）で30～40分の最小潜伏期，80～90の放出価をもつものである．これについて研究を続けているうちに2種類の異なつたプラークを生ずることが観察された．1つ（Ftb）は原株とほぼ等しい大きさであるが白く濁つた不透明のプラークであり，他の1つ（Fs）は透明であるが非常に小さく円形ではなくて不規則な形であつて，大きさの点からは渡辺[7,8]が原株Fをヒドロキシルアミンで処理して得た変異株によつて作られるものとほぼ等しい．この両株がどのような原因によつて生じたかは明らかでないが，少なくとも福本菌を溶菌するものである．しかも研究に際しては汚染防止などに充分注意して操作しており，また原株や宿主菌の純粋分離をしばしばくり返してきたことなどから，F株から変異したものであると推定されるので，この点について二，三の試験を行なつた．

実　　験

宿主菌

Bac. subtilis var. *amyloliquefaciens* FUKUMOTO K 49 いわゆる福本菌は大阪市立大学福本寿一郎教授から頂き，渡辺により主として用いられてきたものであつて，ファージの試験には対数期のものが用いられた．菌の培養[2,3,7]には大豆粕抽出液を主とするMI培地を用い，通常この10 mlをUボートに入れ斜面培養からとつた1白金耳の菌体を接種したのち，37°Cで1晩振盪培養した．必要に応じてはこれらをさらに新しい培養液に植え継ぎ，あるいは遠心分離して菌体を集め，または殺菌した水ないし0.9％ NaCl で適当に稀釈して使用した．

ファージ原株 F

ファージの原株Fも渡辺によつて用いられてきたものであり，その保存液は前報[2]に記載した方法で調製した．

ファージ変異株 Fs

上述のようにF株を福本菌に接種して生成させたプラークの中に混つて観察された透明な小プラークの代表的なものに白金針の先端を軽くふれさせ，これを1～2 mlの0.9％ NaClまたはMI培地にひたして針に付着したファージを液に浮遊させる．一方1.5％寒天を含むMI培地をペトリ皿の中に固め，その表面に数滴の福本菌の懸濁液をおき，上記ファージの浮遊液を1白金耳とつてこれと混合し，さらに1％寒天を含むMI培養液を注いで均一にひろげて固化重層させたのち37°Cに静置しておくと，概略10^2オーダーのプラークを含む平面培養が得られた．典型的なプラークについて同様な分離をくり返してファージを純粋にした．このファージによつて生ずるプラークは既に述べたように渡辺[7,8]によつて得られたF株のヒドロキシルアミン変異株が作るものとよく似ている．

ファージ変異株 Ftb

これもFsの場合と同様に典型的な白濁したプラー

* 勤務先：日本農薬株式会社
† 勤務先：山陽パルプ株式会社

クから純粋分離されたものであつて，その顕微鏡写真を第1図に示す．しかし代表的なプラークについてこのような植え継ぎをくり返しても，その都度約1％の割合で原株Fのプラークに似た透明なものを生じた．

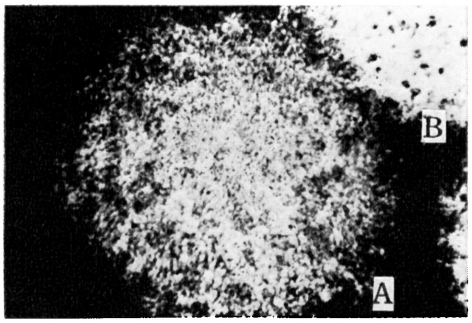

Fig. 1. Plaque formed by F_{tb}.
A : F_{tb}, B : F.

菌およびファージの計測

宿主菌の数はもつとも簡便な比濁法によつて測定し，一応の概略の値を求めるにとどめた．すなわち細菌懸濁液の吸光度と Thoma 血球計で測定した菌の数との間にはある範囲内で直線関係が認められたので，前報[2]に示した標準曲線から概数を求めた．

一方ファージの計測は寒天二重層法により次のように行なつた．直径9 cm のペトリ皿に1.5％寒天を含む MI 培養液約 20 ml を入れ固まらせて下層とする．この表面中央部に対数期の福本菌を3～4滴置く．一方0.9％ NaCl によつて10倍の系列に稀釈したファージの懸濁液 0.2 ml を宿主菌液と混合し，さらに0.7～1.0％寒天を含む MI 培養液を直ちに流し込み下層固形培地上で均一に混合させ放置して固化し上層を作る．引続いて 37°C に1晩放置して生じたプラークの数を計測した．場合によつては適当量の福本菌液，適宜に稀釈したファージ懸濁液および上層寒天培養液を試験管の中で手早く混合しペトリ皿中の下層固形培地上に流し込み重層固化させてプラークを作らせた．測定は通常同一区のものについて3個ずつ行ない，この平均値から原液中のファージの数を計算により求めた．

結果および考察

形態

渡辺[5,7]はさきに原ファージFの形態を電子顕微鏡で観察し，これは直径約 50 mμ，長さ約 120 mμ の円筒状の頭部と長さ約 250 mμ，幅約15 mμ の鞭毛状の尾部をもつ典型的なファージ粒子であるが，とくに頭部が円板を積み重ねたような円筒状である点に従来知られている多くのファージとは異なつた特徴をもつものであることを明らかにした．そこで変異株についてもまずその形態を観察した．比較のために原株Fも含めてこれらのファージを渡辺[4]の方法に従いそれぞれ低速（6,000 r.p.m. 15分，久保田 KR-6-B 冷凍遠心分離機）および高速（25,000～30,000 r.p.m. 60分，日

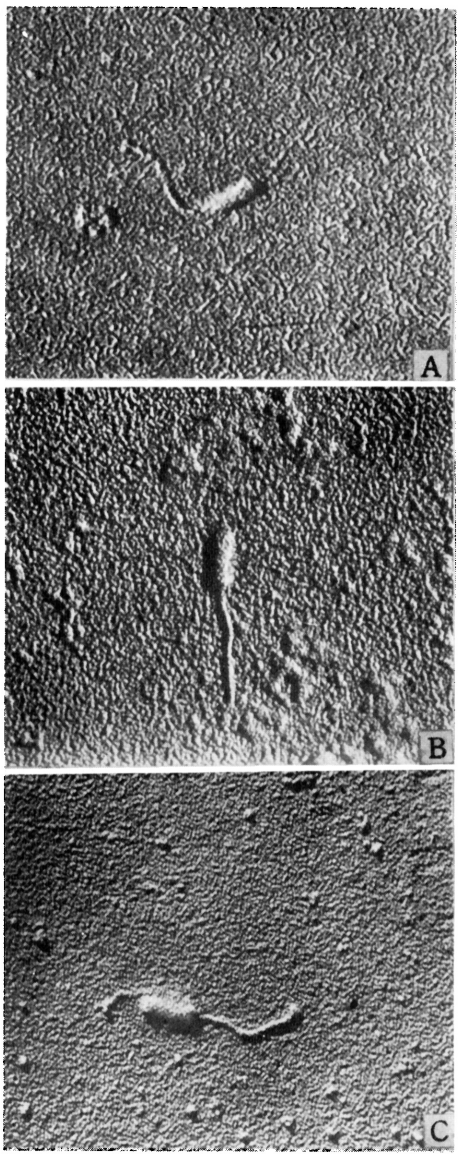

Fig. 2. Electron-micro photograph of phages.
A : strain F.
B : mutant F_s.
C : mutant F_{tb}.

立40P型分離用超遠心分離機）を併用する分別遠心分離法によつて精製し電子顕微鏡写真を撮影した．第2図に示すように，これらファージの形態にはほとんど差異は認められず，福田[1]によつて研究された直径96 mμ の球形頭部，幅 10 mμ，長さ 408 mμ の非常に長い尾部をもつ *Bac. subtilis* var. *amyloliquefacus* という福本菌に似たアミラーゼ生産菌を侵すファージとは明らかに異なつていることを示す．

原株 F の抗血清による中和反応

新しく観察された Fs および Ftb の両株が原株Fの変異株であることを示すためには少なくとも血清学的に類似していることを明らかにしなければならない．

原株Fの抗血清は渡辺により調製されて提供されたものであるが，ファージだけでなく宿主菌に対する抗体も含まれている可能性が考えられるので念のため次のように処理して試験した．すなわち10倍容の MI 培養液に植えかえて16時間振盪培養した対数期の福本菌を遠心分離して集める．菌体を 0.9 % NaCl で1回洗滌したのち 10 ml 抗血清に懸濁し 37°C に5分間保持して宿主菌に対する抗体を除いたのち遠心分離した．こうして得たF株の抗血清 0.2 ml とファージ懸濁液（原液，10倍稀釈液，100倍稀釈液）0.2 ml とを 37°C で混合する．6分間反応させたのちいずれも最終稀釈100倍とし，その 0.1 ml を4滴の宿主菌懸濁液とともに固形寒天培地平板上で混合し常法により，これに上層寒天培養液を加えてプラークを形成させ残存する活性ファージの数を求めた．一方原液のファージの数を求め，この結果から次式に従つて中和反応速度恒数を求めた．

$$K = 2.3\frac{D}{T}\log\frac{P_0}{P}$$

D : Final dilution of anti-serum (2 in the present work).
T : Reaction time (6 in the present work).
P_0 : Number of phages at 0 time.
P : Number of surviving active phages after reaction.

この結果を第1表に示す．

こうして少なくとも Fs および Ftb も原株ファージF の抗血清によつて中和されることは明らかであり，さらに中和反応速度恒数の値もほとんど大差なく Fs および Ftb の両株が血清学的にも F 株と同様の性質をもつことを示している．ヒドロキシルアミンによる変異株の原株Fの抗血清に対する中和反応速度恒数の値は F の値の約50であるので，[7] この点から Fs および Ftb はヒドロキシルアミン変異株よりも原株に非常に近い類縁関係にある変異株であると推定される．

ファージの増殖

渡辺[6,7]は F ファージが最適条件（中性，37°C）で増殖する場合，最小潜伏期30～40分，新生ファージ放出価は80～90であることを明らかにした．そこで変異株についても渡辺の方法に従つて次のように一段増殖実験を行なつた．

37°C に1晩振盪培養した福本菌の菌液1 ml を新しい培地9 ml に加え，さらに3時間振盪培養を続ける．この菌液 1.8 ml にファージ懸濁液（10^6～10^7/ml）0.2 ml を加え 37°C で5分間吸着させる．この吸着液 0.2 ml をとり F ファージの抗血清 0.8 ml に加え同じく 37°C で5分間反応させる．これによつて上記中和試験からも明らかなように吸着されないファージはほとんどすべて不活性化される．中和管の 0.5 ml を 49.5 ml の MI 培地に加えてファージの吸着進行を阻止するとともに抗血清の作用のあらわれない程度にうすめる．さらに，あらかじめ 37°C に保温していた MI 培地で直ちに5～100倍に稀釈，以後経時的に 0.1 ml 宛とつて福本菌の1晩培養液 0.3 ml とともに寒天重層法によつてファージを計測，一段増殖曲線を第3図および第4図に示す．なお，この場合培地の pH は 6.95～7.05 に正確に調節した．

Table 1. Reaction of F, F_s and F_{tb} against anti-F-serum.

Phage	P_0	P	K
F	3.7×10^8	6.4×10^5	2.12
F_s	7.2×10^8	5.6×10^5	2.39
F_{tb}	3.4×10^8	1.1×10^6	1.90

An anti-F-serum was previously treated by host bacterial cells at 37°C for 5 minutes to remove their anti-body. A 0.2 ml aliquot of the serum was mixed with 0.2 ml phage suspension of F, F_s or F_{tb} (original suspension and those diluted 10 and 100 times, respectively) and maintained at 37°C for 6 minutes. After making to 100 times dilution, number of the surviving active phages was counted and K values of F, F_s and F_{tb} were calculated according to the equation.

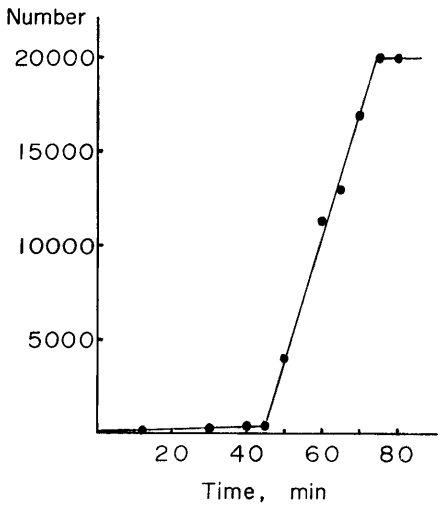

Fig. 3. One step growth curve of F_s.
The host strain *K* 49 was incubated in MI medium at 37°C over night under shaking. A 1 ml aliquot of the culture was added to 9 ml fresh medium and shaken further at 37°C for 3 hours. Into 1.8 ml host suspension obtained, 0.2 ml F_s suspension (10^6～10^7/ml) were added and maintained at 37°C for 5 minutes, 2 ml of which were mixed then with 0.8 ml anti-*F*-serum at 37°C for 5 minutes to neutralize unadsorbed F_s phages. The mixture was further diluted 100 times with MI medium and number of phages was estimated at certain intervals by the routine procedure.

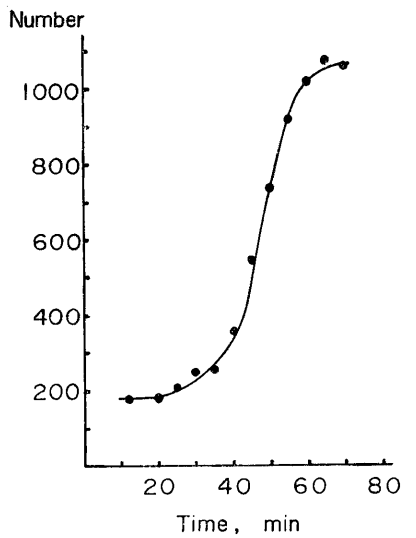

Fig. 4. One step growth curve of F_{tb}.
Estimation was carried out by the same procedure with that in Fig. 3., but with mutant F_{tb}.

ファージの増殖は pH ならびに温度によつてもかなり影響されるので正確な生育特性を明らかにするためにはこれらの条件が検討されなければならない．しかし原株Fの条件と大差はないと思われるので，本実験ではその最適条件（中性，37°C）で検討した．

Fs については潜伏期約45分，上昇期約45～約75分の間と F のものよりも多少長く放出価は65～70と多少低い値が得られた．しかし Fs と同様の微小プラークを生ずるヒドロキシルアミン変異株の放出価約30に比べると原株に近い値を示す．一方 Ftb は潜伏期約35分，上昇期約35分～約65分の間と Fs に比べて多少期間が短く原株のものとほとんど一致する傾向が認められたが，放出価は約6ととくに異常に小さいものであつた．

抵抗菌

前報[2]にのべたように，福本菌はファージ原株Fに対しては12,000ないし13,000に1の割合で抵抗菌を分離することができた，そこで Fs および Ftb についても同様に抵抗性の獲得を試験した．

MI 培地10 ml に1白金耳の福本菌を接種し 37°C に1晩振盪培養し約 5×10^9/ml の菌液を得た．この 0.5 ml を 0.9% NaCl 4.5 ml に添加，以下常法に従つて10倍ないし 10^5 倍稀釈の菌液を調製する．この10倍系列の稀釈菌液それぞれ 0.5 ml を Fs または Ftb ファージ懸濁液 0.5 ml と混合し10分後それぞれ 0.05 ml をとり出して MI 寒天下層培地上におく．ついで 0.7% 寒天を含む MI 培養液で均一にひろげ固化上層としたのち37°Cに1晩放置して抵抗菌により生じたコロニーの数を求めた（表2）．

こうしてこの両変異株についてはその耐性菌が約300ないし約150に1と極めて高い率で分離され，この点原株Fと著しい相違があることを示した．

総　　括

アミラーゼ生産菌 ***Bac. subtilis*** var. ***amyloliquefaciens*** Fukumoto K 49 いわゆる福本菌を侵すバクテリオファージF株と形態的には差はないが，異なつたプラークを生ずる2種のファージを分離し，これがいずれも変異株であることをF株の抗血清に対する中和反応によつて確めた．

その1つ（Fs）は原株 F のものより非常に小さい透明なプラークを生ずるものであつて，潜伏期約45分，上昇期約45分～約70分の間とFのものより多少長いが放出価は65～70と若干低い値をもつことを一段増殖試験によつて確めた．これに対して他の1つ

Table 2. Formation of resistant strains.

Dilution of *K* 49 suspension		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Total number of *K*49 in 0.05 ml suspension applied		1.25×10^{7}	1.25×10^{6}	1.25×10^{5}	1.25×10^{4}	1.25×10^{3}
Number of colonies of resistant strain against	F_s	∞	∞	∞	41	4
	F_{tb}	∞	∞	∞	80	8

A 0.5 ml aliquot of *K*49 suspension of 10 to 10^5 times dilution was mixed with 0.5 ml F_s or F_{tb} phage suspension and 0.05 ml of the mixture were applied on the plate after 10 minuts. The colonies formed were counted and average numbers on each 3 plates were cited in the Table. ∞ means that number of colonies formed were so big that counting could not be conducted.

(Ftb) は原株のものと同様の大きさであるが，白濁不透明のプラークを生じ，潜伏期約35分，上昇期約35分～約65分の間とFとほとんど差はないが，放出価約6と異常に低い値を示した．しかも，この両変異株に対する福本菌の抵抗株は原ファージFに対するものよりも高い率で獲得されやすいことを認めた．

研究に際し種々御助言を賜り，さらに抗血清をいただいた福岡大学渡辺健治助教授ならびに供試した菌株を頒戴した大阪市立大学福本寿一郎教授に感謝申し上げる．（食糧化学教室）

文　献

1) 福田重夫 (1960) J. Gen. Appl. Microbiol. **6**, 90.
2) 小島吉男・桑畑克彦・大村浩久 (1968) 九大農学芸誌 **23**, 135.
3) 渡辺健治・山藤一雄 (1959) 九大農学芸誌 **17**, 253.
4) 渡辺健治 (1960) 九大農学芸誌 **18**, 147.
5) 渡辺健治 (1961) 九大農学芸誌 **19**, 59.
6) 渡辺健治・山藤一雄 (1961) Enzymol. **23**, 353.
7) 渡辺健治 (1962) 学位論文（九大農学部）.
8) 渡辺健治・武末茂・山藤一雄 (1964) Enzymol. **28**, 21.

Summary

The strain F of bacteriophages which attack the typical strain of amylase-producing bacteria, *Bac. subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto K 49, had been investigated by Watanabe[3-8] in our institute. During succeeding study, two mutants of F were isolated.

A mutant Fs forms clear but very small plaque which is closely similar to that of NH_2OH-mutant of F introduced by Watanabe.[8] Another mutant Ftb produces turbid plaque of about the same size with the original clear one of F. However, electron-microscopic examination showed that their shape, especially the characteristic cylindrical head, resembles completely to that of F.

The virulent activity of both Fs and Ftb against the host K 49 was neutralized by anti-F-serum, demonstrating that they must be mutants derived from the strain F. In addition, much difference was not observed among velocity constants for neutralization, K, of the original strain F as well as both mutants against anti-F-serum, contrary to that of NH_2OH-mutant whose K value is about 53 per cent of the original one. This suggests that at least Fs and Ftb are much nearer relation of F than NH_2OH-mutant.

As for the growth of the original strain F in the host cell, it had been already elucidated by Watanabe[6,7] that latent period is about 30 minutes, rise period from about 30 minutes to about 60 minutes and mean burst size about 80～90 under the optimum condition at 37°C and pH = 7. Although the condition of multiplication for Fs and Ftb had not been examined, one step growth curves of them were estimated under the same condition according to Watanabe's procedure for F. It was disclosed that Fs multiplied with latent period of about 45 minutes, rise period from about 45 minutes to about 70 minutes and mean burst size of about 65～70. On the other hand, progeny phages of Ftb were released until about 65 minutes after latent period of about 35 minutes with a remarkably low burst size of only about 6. This estimation indicates that both mutants Fs and Ftb multiply with less efficiency than the original strain F.

Furthermore, resistant strains of the host K 49 against mutants Fs and Ftb were obtained with higher rate than that for F.

Laboratory of Food Chemistry,
Department of Food Science and Technology,
Kyushu University.