

5. *cya* 変異株における λ ファージの増殖

春日 徳彦

Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (Cyclic AMP) は、高等動物においては種々のホルモン作用の細胞内代謝制御物質であり⁽¹⁾、細菌においては多くの適応酵素の産生を、Transcription の段階で Promotor 遺伝子を介して調節する物質であることが近年明らかにされつつある^(2,3)。Cyclic AMP は Adenyl cyclase によって ATP より産生されるが、Adenyl cyclase 遺伝子 (*cya*) の欠損変異株は糖の利用に関して Pleiotropic な表現をとる⁽⁴⁾。Yokota らは *E. coli* Hfr H よりニトロソグアニジン処理によって変異株 Gp1 を得たが、これはラクトース、アラビノース、マルトース、マンニトール、ザイロース、ガラクトース、グリセロールを利用することができなかった。彼らは D. Berkowitz によって分離された *S. typhimurium* DB99, J. Beckwith によって分離された *E. coli* CA7902 および Gp1 の *cya* 変異株を用いて、Cyclic AMP は鞭毛の生合成に必須であることを明らかにした⁽⁵⁾。*cya* 変異株は運動性を失っているが、 10^{-4} – 10^{-5} M の Cyclic AMP の添加により、運動性を回復することを利用して、*S. typhimurium* において *cya* 遺伝子の位置を *met E* と *ilv* の間に決定した⁽⁶⁾が、この位置は *ple* 遺伝子の位置⁽⁷⁾と一致した。Cyclic AMP は糖利用を通じて細菌の表面構造の構成に関与することが考えられたので、*cya* 変異株におけるファージの増殖、吸着を追求した。

材料と方法

使用菌株とファージ：*cya* 変異株は横田より分与された *E. coli* Gp1 および *E. coli* CA7902 を用いた。 λ ファージの指示菌として *E. coli* w3110 を、 λ ファージは野性株より UV 照射によって誘発したものを使用した。

使用培地：*cya* 変異株の増殖には L-broth を、液体培地として他に Penassay broth (Difco) を用いた。 λ ファージの Titre 測定にはラムダ・プレートを用いた。一般的な固型培地として MacConkey 寒天培地 (栄研) を使用した。

使用薬剤：Cyclic AMP は Sigma Chemical Co. 興人化学、第一化学のものをを用いた。使用濃度は 1 mM である。

λ ファージの誘発：振盪培養によって十分に増殖させた *E. coli* K-12 λ^+ 株の培養液 10 ml を 3,000 回転 15 分遠心して集菌し、沈渣を 5 ml の精製水に浮遊させ、直

径 9 cm のシャーレに移して、UV ランプ (Toshiba, 15 w) 下 30 cm で 15 秒間紫外線照射した。2 倍濃度の液体培地 5 ml を加えて 2 時間振盪培養した。クロロフォルムを加えて殺菌し、遠心上清をファージ液として用いた。このようにして得たファージ液の Titre は 8.2×10^9 pfu/ml であった。

λ ファージの増殖：各菌株を 10 ml の L-broth 中で 4 時間振盪培養した。この時、各菌株について 1 mM の Cyclic AMP を加えたものと加えないものとを用意した。十分に増殖した菌液に 0.1 ml のファージ液を加えた。ファージの最終 Titre は 10^8 pfu/ml になるようにした。時間ごとに培養液をとり、適当に希釈してその 0.1 ml と、指示菌である w3110 の培養液 0.1 ml とをラムダ軟寒天中で混和し、ラムダ・プレート上に重層した。37°C で一夜培養後、生じたプラークを数えた。

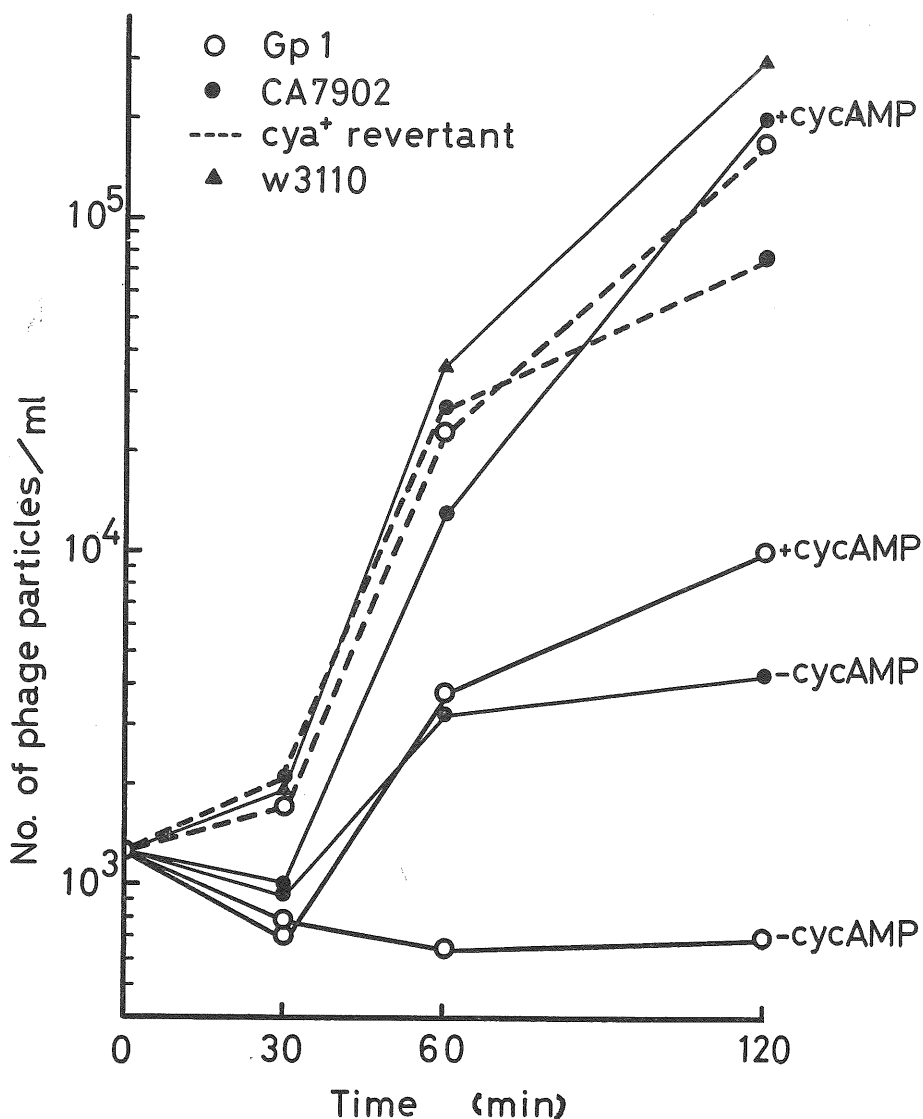
λ ファージの吸着：5 ml の L-broth 中で振盪培養し、十分に増殖した菌液に MOI が 0.1 になるように適当に希釈したファージ液を 0.1 ml 加えた。37°C で 20 分間振盪してファージを吸着させた後、10,000 回転で 15 分遠心した。上清は適当に希釈し、沈渣は遠心で一度洗った後、5 ml の L-broth に再浮遊し、適当に希釈してそれらの 0.1 ml を指示菌 w3110 培養液 0.1 ml とともにラムダ軟寒天中で混和してラムダ・プレート上に重層し、プラークを数えた。

λ ファージの溶原化：CA7902 の培養液に、MOI が 1.0 になるようにファージ液を加え、十分に吸着させた後、希釈して平板上に塗抹した。生じた集落を拾い、純培養した後、 λ ファージによる溶菌をしらべた。抵抗性を示した株で、UV 照射によって λ ファージを誘発できたものを溶原化株とみなした。

結果と考察

cya 変異株である Gp1, CA7902 を宿主菌として Cyclic AMP 添加および無添加の場合について、 λ ファージの増殖をみた結果を図に示した。Gp1 は Cyclic AMP のないときはまったくファージを増殖させることができないが、1 mM の Cyclic AMP 添加で増殖させることができるようになるが、対照に比較して得られるファージ Titre は低い。

CA7902 では Cyclic AMP 無添加でも少量のファージ増殖はあり、添加によって対照とまったく同様に増殖



させることができるようになる。これは CA7902 が Gp 1 に比較して Adenyl cyclase 産生に関してより leaky である⁽⁵⁾ という結果ともよく一致する。Gp 1, CA7902 それぞれの *cya*⁺ revertant では Cyclic AMP の添加なしに正常に λ ファージの増殖が認められることから、*cya* 遺伝子が λ ファージの増殖を規制していることがわかる。

表 1 に吸着実験の結果を示した。Gp 1, CA7902 ともに Cyclic AMP 添加によってそれぞれの Revertant と同様に高率にファージを吸着するが、無添加では吸着率が低い。したがって前図に示した *cya* 株における Cyclic AMP 無添加の場合のファージ産生能の低下は、ファージが宿主菌に吸着できないことによる。

表1 λ ファージの吸着

Strain	cyc AMP	No. of phages (pfu/ml)		adsorption (%)
		unadsorbed	infective center	
Gp 1	+	4.9×10^5	1.5×10^7	97.6—75.0
	—	1.0×10^7	1.6×10^5	50.0—0.8
	<i>cya</i> ⁺ rev	6.8×10^5	1.2×10^7	96.6—60.0
CA 7902	+	9.6×10^4	5.6×10^7	99.5—100
	—	2.1×10^6	5.4×10^5	89.5—27.0
	<i>cya</i> ⁺ rev	4.1×10^5	4.1×10^7	98.0—100

Input phages : 2.0×10^7 pfu/ml

表2 紫外線照射による λ ファージの誘発

Clone No.	Number of phages induced (pfu/ml)	
	without cyc AMP	with 1 mM cycAMP
1	2.3×10^9	6.0×10^9
2	6.1×10^9	6.0×10^9

最後に UV 照射による λ ファージの誘発における Cyclic AMP の必要性をしらべた結果が表2である。*cya* 株に λ ファージを溶原化した CA7902 (λ) からは Cyclic AMP の添加, 無添加にかゝりなく, ファージを誘発することができる。

以上の事実から *cya* 株における λ ファージの細胞内増殖には Cyclic AMP は無関係であり, ファージ産生能の低下は, ファージ Receptor の産生能低下によると結論される。 λ ファージの Receptor 産生遺伝子は *mal* B (Maltose permease) 遺伝子と同一であることが知られており⁽⁸⁾, これは適応酵素と考えられる。

cya 株を用いて培養液への Cyclic AMP 添加あるいは除去をおこなうことによって λ Receptor の産生, 消失の経時の変化を厳密に追求することができると考えられ, 実験を計画している。

cya 変異株を分与くださった順天堂大学医学部細菌学教室, 横田健教授に謝意を表する。

要 約

1. λ ファージは大腸菌の Adenyl cyclase 変異株 Gp 1 または CA7902 を宿主とすると増殖が極めて不良で, 1 mM の Cyclic AMP 添加, あるいは両株の *cya*⁺ revertant を宿主とするとファージの増殖が認められる。

2. Adenyl cyclase 変異株が λ ファージの宿主菌として不適当なのは吸着が不良であることによる。

3. λ ファージの紫外線による誘発には, Cyclic AMP は無関係である。

引用文献

- (1) Robinson, G. A., R. W. Butcher, and E. W. Sutherland. 1968. Cyclic AMP. Ann. Rev. Biochem. **37**: 149-174.
- (2) Chambers, D. A., and C. Zubay. 1969. The stimulatory effect of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate on DNA-directed synthesis of β -galactosidase in cell-free system. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **63**: 118-122.
- (3) Pastan, I., and R. L. Perlman. 1968. The role of the *lac* promotor locus in the regulation of β -galactosidase synthesis by cyclic AMP. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **61**: 1336-1342.
- (4) Perlman, R. L., and I. Pastan. 1969. Pleiotropic deficiency of carbohydrate utilization in an adenyl cyclase deficient mutant of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **37**: 151-157.
- (5) Yokota, T., and J. S. Gots. 1970. Requirement of adenosine 3', 5'-cyclic phosphate for flagella formation in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **103**: 513-516.
- (6) Sanderson, K. E. 1970. Current linkage map of *Salmonella typhimurium*. Bacteriol. Rev. **34**: 176-193.
- (7) Sanderson, K. E. 1967. Revised linkage map of *Salmonella typhimurium*. Bacteriol. Rev. **31**: 354-372.
- (8) Schwartz, M. 1967. Sur l'existence chez *Escherichia coli* K12 d'une régulation commune a la biosynthèse des récepteurs du bactériophage λ et au métabolisme du maltose. Ann. Inst. Pasteur **113**: 685-704.