



Title	乾燥によるEscherichia coliのDNA損傷に関する研究
Author(s)	浅田, 祥司
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2850">https://hdl.handle.net/11094/2850</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

乾燥による Escherichia coli の  
DNA 損傷に関する研究

浅田祥司

目 次

緒 論

第 1 章 乾燥による Escherichia coli の  
DNA 鎮切 断

第 1 節 緒 言

第 2 節 実験材料およ び方法

第 3 節 実験結果

1. 細胞内水分と DNA 鎮切 断

2. DNA 鎮切 断に対する復水条件

の影響

3. 細胞内不凍水分量と DNA 鎮切 断

第 4 節 考 察

第 5 節 要 約

第 2 章 乾燥による Escherichia coli の

突然変異誘発

第 1 節 緒 言

第 2 節 実験材料およ び方法

第 3 節 実験結果

1. 細胞内水分と突然変異誘発

1

13

13

15

26

26

31

32

34

43

45

45

46

52

52

2.	乾燥感受性とDNA修復能	55
3.	乾燥後の再培養によるDNA分子解とDNA修復能	58
4.	DNA鎖切断の再結合修復	59
5.	DNA修復能と突然変異誘発	64
第4節 考察		66
第5節 要約		70
第3章 乾燥による <u>Escherichia coli</u> の突然変異誘発の防止		73
第1節 緒言		73
第2節 実験材料および方法		75
第3節 実験結果		78
1.	保護物質の添加による誘発防止	
	止	78
2.	低温乾燥による誘発防止	83
3.	低温凍結による誘発防止	85
第4節 考察		86
第5節 要約		91
総括		93
文献		99

## 緒論

水は微生物細胞の $\frac{2}{3}$ を占める主要な構成成分の一つであり、細胞内で種々の働きをしている。従って微生物を乾燥処理する場合、様々な生物的効果が同時に生じてくる。この内、最もよく知られているのは細胞の安定化効果であり、そのため乾燥は食品や菌株の長期保存の目的に従来から広範囲に利用されている。しかし、乾燥処理によって同時に起こる他の生物的効果は細胞機能の損傷である。この損傷作用についての研究は、食品の乾燥工程における微生物制御や菌株の保存法の改良に貢献する一方、細胞の生命活動を支える水の役割についても新たな知見を与えることが期待される。

この観点から、乾燥による細胞障害に関する一連の研究はこれまで細胞膜損傷を中心に<sup>1, 2)</sup>行なわれてきた。しかし、細胞膜損傷について得られた成果は代謝障害などの可逆的な細

胞機能障害の多くを説明可能にしたが、不可逆的な乾燥による細胞致死や遺伝的変化などを合理的に説明できなかつた。また、生体高分子の構造維持における水の役割についても何ら知見を与えることはできなかつた。

本研究は以上の理由から、従来、基礎的にも応用的にもその重要さが認識されていたにもかかわらず、詳細が不明である乾燥によるDNA損傷についての基礎的知見を得ることを目的として行なつた。

一般に、何らかの処理によってDNA損傷が起こつてゐるか否かを判断する有力な材料は、処理後の突然変異誘発の有無である。この突然変異の誘発はコロニーの形状、栄養要求性、各種薬剤に対する抵抗性の変化などとして容易に観察することができる。細菌のエアロゾル乾燥後にみられるアミノ酸要求性や糖資化性の変化に関する一連の研究から、最初に乾燥によるDNA損傷の可能性を示唆したのはWebbらである。<sup>3)</sup>ただし、彼らの報告以前に

を乾燥処理によって遺伝的变化が生じることを認めた簡単な報告は幾つか挙げることがで  
きる。

最も古いものは、1949年に Saccharomyces cerevisiae の凍結乾燥処理後、各種ビタミン要求性が高頻度に変化することを認めめたAtkin<sup>4)</sup>の報告、巨大コロニーの形状変化を観察し<sup>5)</sup>たSubramanian Sの報告がある。同じ頃に、<sup>6)</sup>Braun Sも Brucella 菌を凍結乾燥すると、R型(rough type)のコロニーが約1%程度、出現することを認めている。しかし、これらの結果は遺伝的な変化によるものとはみなされなかつた。すなわち、凍結時のcold shock、あるいはあらかじめ存在していた遺伝的変化が生存率の差によって選択的に濃縮された結果、生じたものと考えられた。一方、Servin<sup>7-10)</sup>-Massieus Sは Staphylococcus aureus, Serratia marcescens の凍結乾燥処理後、コロニーのsector形成、色素消失、あるいはストレプトマイシン抵抗性の変化が生じることを認め、

これらは遺伝的変化によるものであると主張した。この根拠として、彼らは凍結乾燥によるこれらの変化は既知の突然変異源である紫外線、X線などによっても同様に起こる事実、ストレプトマイシン抵抗性菌と感受性菌はともに同じ乾燥感受性を示す事實を挙げている。このServin-Massieusの考えは前述したWebbらによつて受け継がれ、さらに詳細な検討が加えられることになった。

3)

Webbらが採用した乾燥法は、細胞懸濁液をエアロゾル状にして、一定相対湿度（以下、RHと略す）で乾燥する方法である。従つて凍結乾燥法などとは異なり、細胞間の相互作用を除き、短時間に細胞を一定水分活性（以下、 $a_w$ と略す）レベルにまで乾燥することが可能であった。彼らはこの方法により、突然変異の誘発と溶原菌のプロファージ誘発がとともに、細胞をRH75%以上で乾燥した時には全く観察されないのに対し、それ以下のRHで乾燥した場合のみ認められ、頻度はRH40%～RH50%

11, 12)

で最大となる事実を見出した。さらにグラム陰性細菌の乾燥感受性と紫外線感受性との間に種々の相関関係が成立することも同時に指摘した。<sup>3, 13)</sup>

この頃には、紫外線による細胞致死、突然変異およびプロファージの誘発かDNAの隣接したピリミジン塩基間に生じる二量体に<sup>14-16)</sup>

よることが明らかにされ、その機構について<sup>16, 18)</sup>多くの知見が蓄積されつづかった。

<sup>3)</sup>これららの理由により、Webbsは紫外線照射と同様、乾燥処理によっても細胞に何らかのDNA損傷が生じているのではないかと強く主張するに至った。DNA損傷として、彼らはDNAの構造維持に寄与する結合水の除去に伴なうDNA分子の収縮を提案した。しかし、実験による具体的な検討は技術的困難から行なわれなかつた。

3, 11-13)

Webbsの一連の報告は、細胞の凍結や乾燥による生物的効果に关心をもつ研究者たちの注目を集め、研究内容も広範囲におよぶようになってきた。まず、菌株については最も乾

燥に対する抵抗性が強いカビや細菌の胞子についても、乾燥処理による遺伝的変化が見出されるようになった。Auerbachらは Neurospora crassa の乾燥した conidia を  $30^{\circ}\text{C}$  で保存すると、時間とともに劣性致死突然変異が顕著に増大するのにに対し、 $4^{\circ}\text{C}$  で保存した場合には極く少し増加するのみであると報告している。<sup>19)</sup> Bacillus subtilis の胞子でも五酸化リン存在下で真空乾燥すると、アジド抵抗性の突然変異頻度が乾燥直後で 19 倍、 $23^{\circ}\text{C}$  で 7 ヶ月保存した後では 250 倍にも増えることが観察された。ところが胞子を水中で保存すると、温度に関係なくアジド抵抗性の変化は全く認められなかつた。この場合、アジド抵抗性胞子と感受性胞子の保存中の生存率変化は同じであることから、アジド抵抗性変化は選択的濃縮によるものとは考えられず、乾燥保存中における胞子中の何らかの DNA 損傷に基づく突然変異によるものと推定された。また、突然変異ではないか、乾燥による DNA 損傷と

関連するものとして、B. licheniformis の形質転換能が凍結乾燥により約  $\frac{1}{10}$  に低下するといふ報告<sup>10)</sup>がある。

既に述べた凍結乾燥法もエアロゾル乾燥法以外の乾燥方法でも遺伝的変化が起こること<sup>21, 22)</sup>があつてきた。坂根らは凍結を伴なわぬL-乾燥法でも細菌に突然変異が誘発される<sup>23)</sup>ことを認めた。彼らの結果では、L-乾燥した細菌を  $10^{\circ}\text{C}$  以上で保存すると、顕著に突然変異の誘発が観察されたのに對し、 $5^{\circ}\text{C}$  以下では有意な誘発は認められなかつた。従つて最も重要な影響因子は保存温度であると結論した<sup>24, 25)</sup>。一方、檜枝らは親水性フィルターを担体とする真空乾燥法を用ひて、乾燥による酵母のアデニン要求性変化に最も寄与の大さい因子は復水時の酸素の存在であるとの結果を得た。しかし、この酸素の効果は細菌の凍結乾燥による突然変異誘発においては認められなかつた。<sup>26)</sup>

乾燥による突然変異誘発を防止する保護物

質の可能性については、乾燥後の生存率を高めることが知られている低分子物質を中心に検討されてきた。<sup>3)</sup> Webbらは myo-inositol がエアロゾル乾燥による細胞致死、突然変異あるいはプロファージの誘発を顕著に防止することを認めている。この保護機構としては、myo-inositol が乾燥により除去される結合水と置換してDNAの構造変化を防ぐためであるとしている。<sup>27-29)</sup> この結果に対して、他の乾燥法では myo-inositol の保護効果は認められず、他の保護物質についても同様の結果であった。

このような遺伝的変化におよぼす酸素、温度、保護物質などの影響因子について違った結果を合理的に説明するのは困難な現状であり、さらに詳細な検討が必要である。

前述のように、乾燥による微生物のDNA損傷に関する報告は遺伝的変化を取り扱ったものが圧倒的に多い。これらの報告から少なくとも言えることは、乾燥による突然変異の誘発は乾燥方法や菌株などに関係なく起こる普

遍的な現象であるという点である。しかし、その原因となるDNA損傷は如何なるものであり、それが如何にして修復され、突然変異の誘発に結びついていくのかという最も重要な問題については、ほとんど研究されていない。従って乾燥によるDNA損傷の基礎的知見を得ることは、乾燥による細胞致死や突然変異誘発の原因解明に不可欠であり、乾燥工程における微生物制御や菌株保存法の改良などにも貢献することが期待される。この目的のために本研究では新たに考案した乾燥法を用い、Escherichia coli の乾燥によって生じるDNA損傷の特性とその修復機構、突然変異誘発の要因とその防止法を中心に検討を行なった。本研究で得られた成果は以下のとおりである。

第1章では疎水性フィルターを担体とする新しい乾燥法について述べ、この方法により得た乾燥によるE.coli のDNA損傷の特性について検討した。まず、この新しい乾燥法では疎水性フィルター上に菌体を捕集し、水蒸気圧を

調整して乾燥するためには、担体に含まれる水分の影響を受けることなく気相と菌体とを急速に水分平衡させることができた。従って乾燥の程度を制御しながら細胞の損傷の程度を観察することができるようになった。この乾燥法により種々のDNA修復能を欠損している E.coli の乾燥感受性を比較し、さらにアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法で乾燥により生じるDNA損傷の特性を調べた。その結果、DNA損傷は細胞内水分活性( $a_w$ )が0.75以上では起こらず、 $a_w$  0.53以下になつて始めて生じ、そのタイプとしてはendonucleaseによる損傷部位の除去を必要としないDNA鎖切断が主であることが明らかになった。このDNA鎖切断の程度は細胞の最終水分レベルのみに依存し、乾燥温度、復水条件、酸素の存在、DNA修復能などに關係なく同じであった。さらに走査型示差熱量計による細胞内の不凍水分量の測定結果と併せて考慮した結果、乾燥による E.coli のDNA鎖切断はDNAの構造維持に

寄与する不凍水の除去が引き金となって生じる物理的ガストレスによるとの仮説を提案した。

第2章では乾燥によって生じたDNA鎖切斷の修復機構、乾燥によって誘発される突然変異の要因を中心に検討した。その結果、DNA鎖切斷の再結合は増殖培地中でのみ観察され、リン酸緩衝液中では全く起こらないことを見出した。また、種々のDNA修復能を欠く突然変異株を供試菌として同様の検討を加えた結果、切斷したDNA鎖の再結合能と乾燥感受性は菌株の組換え能に依存することを明らかにした。従って、この修復には野生型 rec 遺伝子に支配される遅い修復機構が働いているとのと考えられた。一方、乾燥による突然変異の誘発は  $a_w$  0.75以上では全く起こらず、 $a_w$  0.53以下でのみ観察された。この突然変異誘発とDNA修復能との関係については recA 突然変異株のみが全く誘発を示さなかつたのに對し、他の polA, uvrA 突然変異株では親株と同

程度の誘発が認められた。従って以上の結果が E.coli のいずれの株でも認められるな S ば、乾燥による突然変異の誘発は  $a_w$  0.53 以下で生じる DNA 鎮切斷が野生型 rec 遺伝子支配で修復される過程で生じたものと考えた。

第3章では乾燥による DNA 鎮切斷と突然変異誘発の防止のために、保護物質の添加と低温乾燥の二つの方法の効果について検討した。その結果、これら2つの方法では DNA 鎕切斷と突然変異誘発に対して種々の影響は認められなかつたが、両者を完全に防止できなかつた。次に乾燥と並ぶもう一つの重要な菌株保存手段である低温凍結保存法についても同様の検討を行なつたが、凍結によつてはその最低温度に關係なく全く DNA 鎕切斷、突然変異の誘発は観察されなかつた。従つて現時点では、低温凍結処理により菌株保存を行なうのが最も好ましいと考えた。

# 第一章 乾燥による Escherichia coli の

## DNA鎖切断

### 第1節 緒言

如何なる方法で微生物を乾燥処理してもDNAに異常をきたすことが多くの報告が知られて  
いる。たとえば、Escherichia coli のエアロ  
ゾル乾燥では糖質化性の変異とプロファージの  
<sup>11)</sup>  
<sup>12)</sup> 誘発が観察されている。凍結乾燥の場合、E.  
coli でアミノ酸要求性の変異が、S. cerevisiae  
<sup>26)</sup>  
<sup>30)</sup> でアデニン要求性変異が起こることが知られ  
ていて、最近では、親水性フィルター上で常  
圧乾燥によつても S. cerevisiae に突然変異が  
<sup>24)</sup>  
誘発されることが櫻枝らによつて報告されて  
いる。

この突然変異の誘発機構を解明するためには、乾燥処理によって生じていると推定され  
るDNA損傷についての知見が不可欠である。  
しかしながら、これについての報告は極めて  
少なく、二三の簡単な結果が知られているの

26, 31)

みである。すなわち、E.coli の凍結乾燥後に、あるいは Salmonella typhimurium の凍結融解の過程で DNA 鎌切断が起こることが報告されている。<sup>32)</sup> 本章では乾燥による DNA 損傷の特性を知るために、細胞内水分量と DNA 損傷の関係、ならびに DNA 損傷に対する復水方法の影響を検討した。

微生物の乾燥実験を行なう上での問題点の一つは、細胞の乾燥方法である。親水性の担体上で細胞を乾燥させた場合、担体に含まれる水と細胞間の相互作用によつて細胞周囲の RH との平衡到達が妨げられることがある。これを解決するためにはエアロゾル乾燥法の使用<sup>33)</sup>か Webb と Strange<sup>11)</sup>によって勧められていく。しかし、この方法は特別な装置を必要とするだけではなく、DNA 損傷の解析が可能になるだけの試料が得られない難点がある。一方、凍結乾燥法では試料の乾燥程度を厳密に制御できないう欠点がある。この問題点を解消するために菌体を疎水性フィルター上で薄層状に捕

集し、細胞内水分を制御しながら乾燥する方法を新たに考案した。本章ではこの新しい乾燥法により、E.coli の乾燥による DNA 損傷の可能性について検討し、細胞内水分活性 ( $a_w$ ) が 0.53 以下になるとまで乾燥すると DNA 鎮切断が生じるとの結果を得た。

## 第2節 実験材料および方法

供試菌 本章では DNA 修復能欠損株の高い乾燥感受性から細胞内水分活性 ( $a_w$ ) と DNA 損傷の関係を検討するため、E.coli K-12 AB 1157 (thr leu pro arg thi lac gal ara xyl mtl tsx<sup>r</sup> str<sup>r</sup> F<sup>-</sup>)、E.coli K-12 AB 2480 (AB 1157 uvrA recA) および B.subtilis 168 (thy try) を供試菌として用いた。各遺伝子記号は次のとおりである。

thr, threonine; leu, leucine; pro, proline; his, histidine; arg, arginine; thi, thiamine; lac, lactose; gal, galactose; ara, arabinose; xyl, xylose; mtl, mannitol; tsx, T6 phage; str

, streptomycine; r, resistant; thy, thymine および try, tryptophan の各要求性突然変異である。<sup>18)</sup> また, UVR 突然変異株では宿主回復現象の低下と紫外線感受性の増加が, rec 突然変異株では遺伝的組換入能の低下と紫外線感受性の増加がみられる。B. subtilis 168 は醸酵工学科室保存菌であり, E. coli の両株は大阪大学医学部 近藤宗平教授より供与されたものである。

試料調製 B. subtilis 168 を除き, 各供試菌は EM-9 培地中で好気的に 20 時間, 37°C で培養した。EM-9 培地の組成は  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1.8%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.24%,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0.2%,  $\text{NaCl}$ ; 1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.05%, glucose; 0.4%, casamino acid (Difco); 0.2%, thiamine; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であり, pH 7 に調整した。次に菌体を脱イオン水で集菌洗浄した後, 約  $10^8$  の細胞をあらかじめ 98% エタノールに 1 分間浸漬した疎水性フィルター (Millipore FIGLP02500, 直径 25 mm) 上に沪過捕集し, 乾燥用試料とした。この場合, 細胞 1 個

の大きさは顕微鏡観察の結果、約 $2\text{ mm}^2$ であった。従って使用したフィルターの有効面積が $314\text{ mm}^2$ であることを考慮すれば、約 $10^8$ 個の細胞はフィルター上では一層または二層位の薄層状態で捕集されていふとみなすことができる。

この試料を既知のRHを与える飽和塩溶液の入った真空デシケーター内に移し、塩溶液が沸騰し始めるまで減圧にした後、一定時間、室温(約 $20^\circ\text{C}$ )で放置した。RH 0% のまゝでの乾燥処理は試料を五酸化リンとシリカゲルからなるデシケーター内に入れ、約 0.1 Torr まで真空にした後、一定時間、放置した。飽和塩溶液としては 85%, 75%, 53%, 33% の関係湿度を与えるために、それぞれ KCl, NaCl,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を用いた。乾燥終了後、フィルターを 3 ml の 0.03 M トリス一塩酸緩衝液(pH 8.0)に投入して捕集細胞を復水し、Vortex ミキサーにより菌体をフィルターから分離し、懸濁液を得た。この細胞懸濁液を復水試料として、使用開始まで冰浴中へ放置した。

この方法では疎水性フィルター上に付着した E. coli K-12 種の菌体は 90% 以上回収することができた。また、菌体の沈過捕集時に使用したエタノールによる生存率や DNA への影響は認められなかった。

他の復水方法 本章では特に断わらぬ限り、乾燥した細胞は既に述べたように 0.03 M トリス-塩酸緩衝液で復水するか、または室温で EM-9 培地により復水した。復水時の酸素や浸透圧の影響を調べる場合には、次の様な方法を用いた。

i) 酸素に接触させずに復水する場合

乾燥終了後、純粹の窒素ガスを乾燥菌体の入った真空デシケーター内に導入して常圧に戻し、窒素置換した緩衝液で復水した。その手順の詳細を Fig. 1 に示す。

ii) 高張液で復水する場合

二つの方法を試みた。一つは 3 ml の 20% sucrose 溶液にフィルターを投入して細胞を復水、懸濁した後、元の細胞懸濁液を透析チューブ (Visking)

に入れ、3lの脱イオ

ン水に浸し、2°Cで

3時間透析する方法

である。もう一つの

より簡単な方法とし

て、3mlの20% sucrose

溶液で復水後、直ち

に脱イオン水を加え

て5%まで希釈し、そ

の内の0.1mlをアルカ

リ性ショ糖密度勾配の

上に直接のせて超遠心分析を試みた。

iii) 飽和水蒸気で復水する場合

乾燥終了後、RH100%を与えるデシケーター

内に試料を移し、減圧下で1時間、飽和水蒸

気に乾燥菌体をさらすことにより復水した。

以後の手順は前述したとおりである。

### 生存率の測定

3mlの0.03Mトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で復水すると直ちに、その復水試料を脱イオン水で希釈し、nutrient broth(ホ

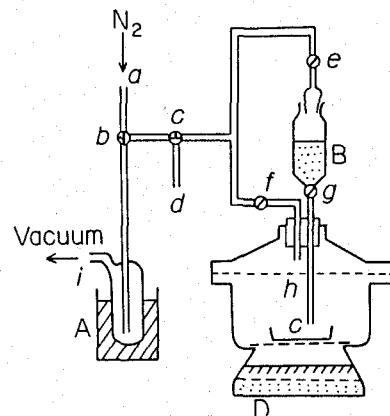


FIG. 1. Apparatus for rehydration in the absence of air. (A) Cold trap with liquid nitrogen; (B) 0.03 M Tris-hydrochloride buffer solution (pH 8.0); (C) a filter membrane mounted with bacteria; (D) saturated salt solution or  $P_2O_5$  for producing required  $a_w$ ; (b, c) three-way cock; (e, f, g) two-way cock. First, pure nitrogen gas was passed through a, b, c, and d. Then e was closed and h and c were turned to evacuate h through the line f, c, b, i until D started to boil. After drying C, f was closed, e was opened, and b was turned to eliminate the dissolved oxygen in buffer solution by repeating the vacuumizing and the induction of pure nitrogen gas. Then f was opened and dry pure nitrogen gas was introduced into B and h. Finally, g was opened and C and B were rehydrated.

リペpton; 1%, 肉エキス; 0.5%, NaCl; 0.2%, 寒天; 1%, pH 7.0) の寒天培地上に塗布した。コロニー数の測定は 37°C で 18~24 時間培養後行なった。

アルカリ性ショ糖密度勾配遠心法による E.coli の DNA 分画 供試菌を  $6 \mu\text{Ci}/\text{ml}$  の [methyl- $^3\text{H}$ ] thymidine (24 Ci/mmol; the Radiochemical Centre, Amersham, England) と  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  の 2'-deoxyadenosine を含む EM-9 培地中で 20 時間, 37°C で 培養した。試料を前述のように乾燥, 復水, 鮎濾した後, その 0.5 ml をとり氷冷下で 0.05 ml の 4% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を加えて混合し, 遠心分離用試料とした。

アルカリ性ショ糖密度勾配遠心法は N-lauroyl sarcosine(半井化学) の添加を除いとは, Kato<sup>33)</sup> および Kondo らの方法に準じて行なった。すなわち, あらかじめポリエチレンの遠心分離管 ( $1.3 \times 5.0 \text{ cm}$ , 日立工機 5 PE) 中に調製した 4.3 ml のアルカリ性ショ糖密度勾配上に, 0.1% N-

lauroyl sarcosine を含む 0.2 ml の 0.5 M NaOH を  
溶菌のために加え、さらにその上に遠心分離  
用試料 0.1 ml をのせ、20 °C で 30 分放置した。ス  
ウイングローター(日立 RPS 50-2)を装着した日立  
超遠心分離機 55 P を用い、40,000 rpm で 40 分間  
, 20 °C で遠心分離した。分離後、液の表層か  
ら水圧をかけながら、遠心分離管の底にあけ  
た針穴から 4 滴ずつ円形沪紙(Whatman, No.3,  
直径 22 mm) 上に滴下、吸収させ、赤外線ラン  
プで充分乾燥後、4 °C に冷却した 5% trichloro  
acetic acid(TCA)で 2 回、acetone(4 °C)で 1  
回洗浄した。再び円形沪紙を乾燥後、0.6% の  
2,5-diphenyloxazole を溶解させた toluene 10  
ml を含むヘイアルに移し、液体シンチレーショ  
ンカウンター(Beckman LS-250)で放射活性を  
測定した。アルカリ性ショ糖密度勾配は次のよ  
うに調製した。1 mM EDTA, 0.7 M NaCl および  
0.1% N-lauroyl sarcosine を含む 5%, 20% の  
sucrose(Sigma)溶液(pH 12)をそれぞれ調製し  
, まず遠心管に 60% sucrose 溶液 0.3 ml を入れた。

次いで、グラディエンター(ミツミ科学, SJ-1300 UD)を用い、その上に5~20%のショ糖密度勾配(4.3ml)を調製した。

アルカリ性ショ糖密度勾配遠心法による *B. subtilis*  
のDNA分画 供試菌を  $10 \mu\text{Ci}/\text{ml}$  の (methyl- $^3\text{H}$ ) thymidine ( $24 \text{ Ci}/\text{m mol}$ ; the Radiochemical Centre, Amersham, England),  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  の tryptophan,  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の thymidine を含む Spizisen 改変培地中で  $\text{OD}_{660\text{nm}}$  が 0.8 に達するまで  $37^\circ\text{C}$  で培養した。

Spizisen 改変培地は脱イオン水  $1 \ell$  当たり,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 14g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2g, sodium citrate; 1g, potato extract; 5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 200mg, glucose; 5g,  $\text{CaCl}_2$ ; 40 $\mu\text{g}$  および  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含んでいる。培養終了後, 脱イオン水による集菌洗浄を 3 回行ない, 約  $10^9$  の細胞を疎水性フィルター (Millipore FGLP 02500, 直径 25mm) 上に沪過捕集した。この試料を *E. coli* で用いた方法により, 90 分間乾燥処理を行なった。この乾燥試料を 0.5M sucrose, 0.15% EDTA, 0.25mM NaCl および 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の lysozyme (Sigma)

を含む3mlの0.03Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.0)で復水、懸濁した。この細胞懸濁液を30°Cで30分間放置してスフェロプロラストに変え、遠心分離用試料とした。

アルカリ性ショ糖密度勾配遠心法によるDNA分画は、以下の点を除いては E.coli で用いた方法によった。あらかじめ調製したアルカリ性ショ糖密度勾配上に、2% sodium dodecylbenzene sulfonate (SDS) を含む0.1mlの0.5N NaOHを加え、さらにその上に遠心分離用試料0.2mlをのせ、20°Cで20分放置した。遠心分離は30,000 rpmで90分間、20°Cで行ない、以後の手順は E.coli の場合と同じである。

DNAの沈降パターンの解析 アルカリ性ショ糖密度勾配遠心法で得られた各試料のDNA沈降パターンの解析のために、フラクション番号は遠沈管のメニスカスからの相対距離に、各フラクションごとの放射活性は試料中の全放射活性に対する百分率に換算した。さらに乾燥によってDNAはランダムに切断されると仮

34)

定し, Townらの方法により DNA 分子量と切断数を求めた。すなわち, single-strand genome当たりの切断数 $n$ は,  $n = 6 \left[ \left( D_1/D_2 \right)^{2.63} - 1 \right]$ の式(ただし,  $D_1$ と $D_2$ はそれぞれ未乾燥および乾燥した E.coli からの DNA の相対的な沈降距離である)から, DNA 分子量は  $D_1/D_2 = (M_1/M_2)^{0.38}$  の式(ただし,  $D_1$ と $D_2$ はそれぞれ分子量  $M_1$  および  $M_2$  の DNA の相対的な沈降距離である)から算出した。

ここで DNA 分子量の標準物質として使用したのは, 広瀬らの方法により調製した T4 ファージであり, その分子量は文献値から single-strand genome 当たり  $6 \times 10^7$  として計算した。

#### 不凍水分量と限界水分活性の測定 試料

としては E.coli K-12 の定常期細胞以外に, 壓搾パン酵母(オリエンタル酵母), 脱脂乳(Difco)および卵白アルブミン(和光純薬)を用いた。まず, 脱イオン水で懸濁した試料を遠心分離後, 沖紙上で予備乾燥した。次に吸湿および脱湿の二つの過程を経て種々の  $a_w$  になるように試料を調湿した。脱湿試料は, 乾燥重量当た

35)

36)

り約30mgの試料を走査型示差熱量計(理学電機製, 低温型)専用のアルミニウム製容器に詰め, 所定のRHを与える飽和塩溶液の入ったデシケーター内で24時間調湿することにより得た。吸湿試料はあらかじめ試料を凍結乾燥した以外, 脱湿試料の調製と同じ方法により得た。

このようにして種々の $a_w$ に調湿した試料と対照試料(銀粉)を走査型示差熱量計に移し, 5°C/minの速度で-100°Cまで冷却して10分後, 再び5°C/minの昇温速度で加温し, サーモグラムを得た。<sup>37)</sup>不凍水分量はSimatosらの方法により算出した。まず, 試料中の凍結水分量はサーモグラムからの融解熱より, 水分含量は真空乾燥(五酸化リンとシリカゲル存在下で24時間)後の重量減少より求め, 不凍水分量は両者の差として計算した。限界水分活性(critical  $a_w$ )は試料中の凍結水分がなくなり, 不凍水分のみになり始める限界の $a_w$ であると定義し, 試料の $a_w$ と融解熱の関係より求めた。

### 第3節 実験結果

#### 1. 細胞内水分とDNA鎖切断

##### 乾燥過程中の *E.coli* の死滅      薬水性フィル

ター上で *E.coli* を乾燥した時の DNA 損傷を調べるために、DNA 修復能欠損株とその親株の乾燥感受性を比較検討した。DNA 修復能欠損株のうち予備実験で最も高い乾燥感受性を示した AB2480 (uvrA recA) 株を実験に用いた。その親株は AB1157 株である。

AB2480 株は親株に比べて著しく高い感受性を示すのにに対し、RH 75% 以上で乾燥した場合には親株と同程度の感受性しか示さなかつた (Fig. 2)。乾燥しない場合、AB1157 株および AB2480 株の顕著な生存率低下は 90 分以内では認め

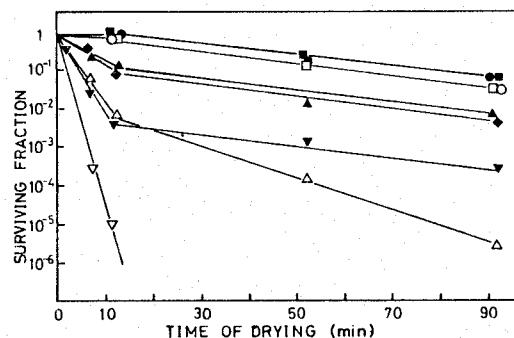


FIG. 2. Survival of *E. coli* K-12 AB1157 (*uvrA*<sup>+</sup> *recA*<sup>+</sup>) and AB2480 (*uvrA* *recA*) after drying at various RHs. About 10<sup>8</sup> cells were mounted on a hydrophobic membrane filter, dried at a given RH, and rehydrated with 0.03 M Tris-hydrochloride buffer (pH 8.0). Cell suspensions were then diluted with deionized water and plated on nutrient agar. Colonies were counted after 24 h of incubation at 37°C. Each value is an average of duplicate determinations; counting errors between two determinations were less than 28%. Solid and open symbols indicate responses of *E. coli* K-12 AB1157 (*uvrA*<sup>+</sup> *recA*<sup>+</sup>) and AB2480 (*uvrA* *recA*), respectively. Symbols: □, RH 85%; ○, RH 75%; △, RH 53%; ◇, RH 33%; ▽, RH 0%.

められなかつた。この結果は  $a_w$  0.75 から  $a_w$  0.53 の間を境として DNA 損傷が起こり始めていることを示唆している。

一方、E. coli の死滅経過は乾燥初期(12分位まで)とさらに乾燥を続けた場合とは異なった傾向が認められる。すなわち、前者では乾燥後の生存率が  $a_w$  の減少とともに顕著に低下するのに対し、後者では  $a_w$  に関係なく乾燥時間とともに徐々に低下していく。この理由は不明であるが、同じような死滅経過は Webb らのエアロゾル乾燥法でも報告されていることから乾燥法自体に起因しているのではないと思われる。このような乾燥初期にみられる AB 2480 株の高い感受性や  $a_w$  に依存した死滅は所定の RH と平衡になる過程で起こり、主に乾燥自体の効果を反映したものと考えられる。何故ならば多量の菌体(乾燥重量当たり約 20 mg)を用いて重量法により検討した結果、各所定の  $a_w$  になるまでに必要な時間は 10 分から 15 分以内と推定されたからである。

乾燥による E.coli の DNA 鎮切断 次に Fig.

2 の結果から示唆された DNA 損傷をアルカリ性シロ糖密度勾配遠心法により検討した。乾燥時間が 12 分の時の結果を Fig.3 に、92 分の時の結果を Fig.4 に示した。

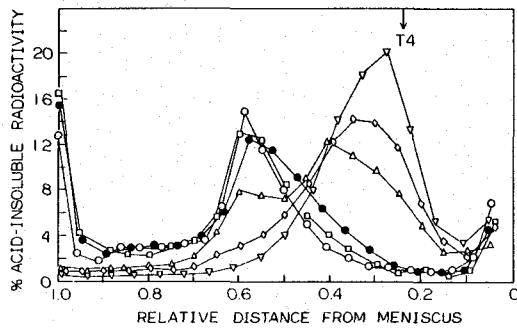


Fig. 3. Sedimentation in alkaline sucrose gradient of DNA from dried *E. coli* K-12 AB1157 (*uvrA<sup>+</sup>* *recA<sup>+</sup>*). <sup>3</sup>H-labeled cells were dried to a given  $a_w$  at the corresponding RH for 12 min, then rehydrated with 0.03 M Tris-hydrochloride buffer (pH 8.0), as described in the legend to Fig. 2. Cells were directly lysed on top of the alkaline sucrose gradient without spheroplast formation and centrifuged as described in the text. The direction of sedimentation is from right to left. Vertical arrow indicates the position of DNA from T4 phage. Symbols: ●,  $a_w$  1.0 (not dried); □,  $a_w$  0.85; ○,  $a_w$  0.75; △,  $a_w$  0.53; ◇,  $a_w$  0.33; ▽,  $a_w$  0.

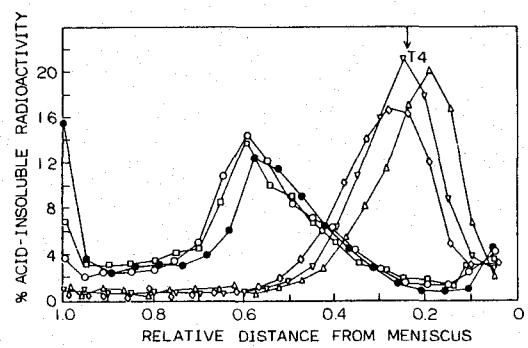


Fig. 4. Sedimentation in alkaline sucrose gradient of DNA from dried *E. coli* K-12 AB1157 (*uvrA<sup>+</sup>* *recA<sup>+</sup>*). <sup>3</sup>H-labeled cells were dried to a given  $a_w$  at the corresponding RH for 92 min. Rehydration, lysis, and sedimentation were performed as described in the legend to Fig. 3. The direction of sedimentation is from right to left. Vertical arrow indicates the position of DNA from T4 phage. Symbols: ●,  $a_w$  1.0 (not dried); □,  $a_w$  0.85; ○,  $a_w$  0.75; △,  $a_w$  0.53; ◇,  $a_w$  0.33; ▽,  $a_w$  0.

Fig.3 から明らかのように、 $a_w$  0.53 以下では DNA の 1 本鎮切斷がみられるのに対し、 $a_w$  0.75 以上では全く認められない。Fig.4 でも、 $a_w$  0.53 以下では Fig.3 の場合よりも若干の切斷程度の増大がみられるがほぼ同様の傾向を示している。この結果は DNA の 1 本鎮切斷が主に乾燥

初期の12分以内に起こっており、0.53以下の所定の $a_w$ に到達するまでの乾燥過程を含んでいる。従ってAB2480株の高感受性と同様、乾燥自体の効果によってDNA鎖切断が引き起こされている可能性が強いと思われる。

乾燥によるDNA鎖の切断数をFig.3の結果か  
35) STownらの方法によって計算し、E.coliの等温吸着曲線とともにFig.5に示した。切断数は $a_w$  0.75以下(残存水分量にして15%以下)で

は $a_w$ の低下とともに直線的に増加した。

これは乾燥初期のE.coliの死滅傾向(Fig.2)とよく一致し、DNA損傷

が乾燥による細胞致死と密接な関係にあることが予想される。

乾燥によるB.subtilisのDNA鎖切断 DNA損傷ならびに突然変異の誘発はグラム陰性細菌だけでなく、乾燥に対して抵抗性を示すゲ

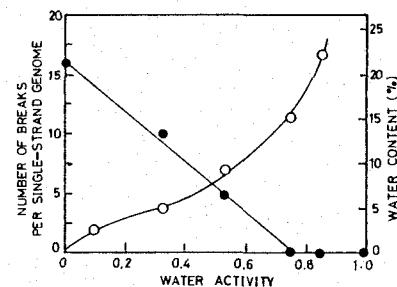


FIG. 5. Relationship between the number of breaks per single-strand genome caused by drying and  $a_w$  level of cells. From the results shown in Fig. 3, the number of breaks was calculated by the method of Town et al. (35). Water content of cells at each  $a_w$  was measured as the difference in weight between dried cells and cells equilibrated at each RH. Solid and open circles indicate the number of breaks and water content of cells at a given  $a_w$  level, respectively.

ラム陽性細菌、細菌胞子、酵母でも乾燥方法に關係なく生じることが知られている。DNA鎖切斷および突然変異の誘発が菌株の乾燥感受性とは關係なく起こることを確かめるために、B. subtilis の栄養細胞を用いて検討した。  
 $a_w$  0になるまで乾燥すると、生存率は B. subtilis で 5.0%，E. coli で 0.2% であった。DNA鎖切斷は Fig. 6 に示すように  $a_w$  0.53 以下で認められ、 $a_w$  0.75 以上では認められなかつた。この結果は、同じ乾燥条件で行なつた E. coli での結果 (Fig. 4) とよく一致し、乾燥による DNA 鎖切斷が普遍的な損傷であることを支持している。

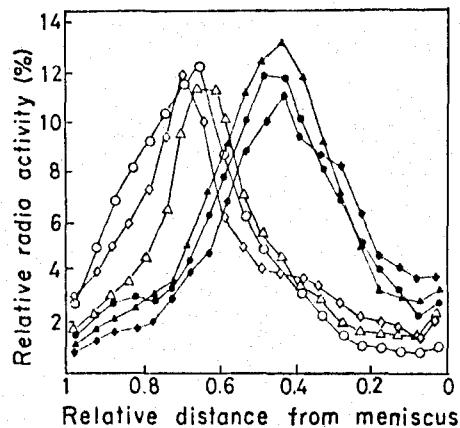


Fig. 6. Sedimentation profile of DNA from dried *B. subtilis* 168 (*thy*<sup>-</sup>, *try*<sup>-</sup>).

<sup>3</sup>H-labeled cells were dried to a given water activity ( $a_w$ ) at the corresponding RH for 90 min, rehydrated, converted to spheroplasts, and centrifuged. See text for experimental details. The direction of sedimentation is from right to left.

Symbols: ○,  $a_w$  1.0 (not dried); ◇,  $a_w$  0.85; △,  $a_w$  0.75; ▲,  $a_w$  0.53; ●,  $a_w$  0.33; ♦,  $a_w$  0.

## 2. DNA鎖切断に対する復水条件の影響

以上の実験結果から乾燥による E. coli の DNA 鎖切断が確かめられた。しかし、この損傷が乾燥時に生じたものか、あるいは復水時に生じたのかは明らかではない。この点を明確にする目的で DNA 鎖切断に及ぼす復水条件の影響を検討し、得られた結果を Table 1 に示した。

復水時の影響因子

としては Strange らや

38)

Israelis によって指

摘されていゝ酸素があ

る。Fig. 1 に示した

装置を用いて、乾燥

終了後、窒素ガスで

常圧に戻し、さらに

窒素置換した 0.03 M +

リス一塩酸緩衝液 (pH 8.0)

で復水を行なった。しかし、その結果は他の

復水方法での結果と変わらず、酸素の影響の

可能性は除外された。

TABLE 1. Effect of rehydration on the decrease in DNA molecular weight of *E. coli* AB2480 after drying<sup>a</sup>

Rehydration <sup>b</sup>	DNA in rehydrated bacteria <sup>c</sup>
Not dried	(5.4 ± 0.26) × 10 <sup>8</sup>
Tris-hydrochloride buffer solution (0.03 M, pH 8.0, control method) at room temp (ca. 20°C)	(2.3 ± 0.21) × 10 <sup>8</sup>
Tris-hydrochloride buffer solution at 0°C	2.2 × 10 <sup>8</sup>
Tris-hydrochloride buffer solution at 37°C	2.2 × 10 <sup>8</sup>
EM-9 medium	2.2 × 10 <sup>8</sup>
Oxygen-free Tris-hydrochloride buffer solution (0.03 M, pH 8.0)	2.0 × 10 <sup>8</sup>
20% Sucrose and diluted to 5%	2.6 × 10 <sup>8</sup>
20% Sucrose and diluted in cellulose tube	2.6 × 10 <sup>8</sup>
Saturated water vapor	1.7 × 10 <sup>8d</sup>

<sup>a</sup> Dried at RH 0% for 12 min.

<sup>b</sup> See text for experimental details.

<sup>c</sup> Values indicate average molecular weight ± standard deviation from mean value.

<sup>d</sup> Value was significantly different at  $P < 0.05$  from value obtained by control method.

次に検討したのは復水時の浸透圧ショックの影響である。20% sucrose の高張液で復水した後、透析で徐々に希釈するか、あるいは 5% sucrose 濃度にまで直接、希釈する方法により DNA 鎮切斷の有無を調べたが、浸透圧ショックの影響は認められなかつた。さらに高張液の代りに、飽和水蒸気を乾燥菌体にさらすことにより徐々に復水する方法を検討したが、DNA 鎮切斷が観察された。この場合、切斷の程度はむしろ若干増大する傾向が認められたがその理由は不明である。

一方、常温で復水した場合は何らかの酵素作用の影響の可能性がある。そこで復水温度を変えて同様の検討を行なつたが、0°C でも 37°C でも同程度の DNA 鎕切斷が観察された。従つて、Fig.3 および Fig.4 で示した DNA 鎖切斷は復水時ではなく乾燥時に生じたものと結論した。

### 3. 細胞内不凍水分量と DNA 鎖切斷

$\alpha_w$  は細胞内における水の存在状態と密接な

39-42)

関係があると一般に考えられている。一方, Fig.2, Fig.3 および Fig.4 の結果から乾燥による E.coli の死滅と DNA 鎮切断は  $a_w$  に依存するこことが見出された。そこで、このような乾燥による生物的效果が細胞内の水の存在状態とのように関係しているのかを調べる目的で、走査型示差熱量計により種々の生物試料の不凍水分量を測定した。Table 2 には得られた不凍水分量と各種試料の限界水分活性（以下、critical  $a_w$  と略す）の値を同時に示した。

不凍水分量は試料によってさ異なるし、また同一試料でも調湿過程によって異なっている。ところが critical  $a_w$  であると、いずれも 0.75 か 0.80 とほぼ一致した値を示している。critical  $a_w$  は凍結水がなくなり、不凍水のみになり始める限界の  $a_w$  と定義されている。従って E.coli

TABLE 2. Unfreezable water content of various samples measured by differential scanning calorimetry and the critical  $a_w$

Sample	Unfreezable water content (g/g, dry wt)	Critical $a_w^a$
<i>S. cerevisiae</i> in adsorption process	0.18	0.75
<i>S. cerevisiae</i> in desorption process	0.24	0.75
<i>E. coli</i> K-12 AB1157 in desorption process	0.23	0.75
Egg albumin in desorption process	0.28	0.80
Skim milk in adsorption process	0.10	0.80
Skim milk in desorption process	0.13	0.80

<sup>a</sup> See text for definition of critical  $a_w$ .

RE C162

の場合、乾燥により細胞内から凍結水がすべて除去され、不凍水を奪われ始める時の $a_w$ が0.75であることを意味している。このE. coliのcritical  $a_w$ は本章で既に見出した乾燥による生物的効果、すなわち細胞致死あるいはDNA損傷が起ころり始める時の $a_w$ とよく一致している。

従って、不凍水の細胞における重要な役割<sup>3)</sup>の一つは生体高分子の構造維持にあることから、乾燥によるE. coliのDNA鎖切断の引き金となっているのはDNAの構造維持に寄与する不凍水の除去であると考えられる。

#### 第4節 考察

乾燥による生物的効果についての従来の報告と比べて、本章で述べた実験で特に考慮したのは次の二点である。

一つは乾燥程度を水分含量としてではなく、 $a_w$ として表わしたことである。この理由としては本章で用いた乾燥法の場合、極く少量の

菌体しか乾燥しないので、水分含量の代りに  $a_w$  として乾燥程度を制御した方が容易かつ正確であること、各種試料中の水の活性を示すには水分含量よりも  $a_w$  の方がより直接的なパラメーターであることを挙げることができ。もう一つの考慮した点は試料の担体としてテフロン製の疎水性フィルターを用い、少量の菌体を薄層状にして乾燥したことである。この新たに考案した方法では担体中に含まれる水の影響を除き、短時間に乾燥を完了させることができ。その結果、乾燥中に起こるかもしれない二次的な反応を防ぎ、乾燥のみの生物的効果を観察できるようになつた点である。

本章でまず問題としたのはどの程度まで細胞を脱水すれば、DNA 損傷が起こり始めるかである。DNA 修復能欠損株とその親株の乾燥感受性の比較(Fig.2)およびアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法での結果(Fig.3, Fig.4)から、 $a_w$  0.53以下になるとまで乾燥を行なつた時に DNA

鎖切断が起らざり始めると、この結論が得られた。

細胞の乾燥程度に著しい影響を受ける事実が知られているのは紫外線感受性の場合であり、<sup>3, 13, 43)</sup>特異的な生物的効果としてあるのは空中

<sup>46)</sup>浮遊細菌の紫外線殺菌の面から注目されている。この乾燥による急激な紫外線感受性の増大は菌株に関係なく  $a_w$  0.75 以上ではみられず、 $a_w$  0.53 以下になるとまで乾燥した時にのみ認められるといふ点では一致しているが、その原因については研究者によつて異なった仮説

<sup>44)</sup>が出されている。Riley<sup>5</sup>は細胞集団中の紫外線感受性分布の変化を、Hieda<sup>6</sup>は非光回復性の胞子型光生成物 (5-thymyl-5,6-dihydrothymine) の出現の可能性を提案している。

本章で得られた結果はこれらとの考え方とは別に、以下の仮説によつても説明可能であることを示している。 $a_w$  0.75 以上では DNA の隣接したピリミジン塩基間に生じる二量体 (ほとんどがシクロブタン型チミンダimer) が損傷の主体であり、光回復あるいは暗回復によつて

容易に修復されるために低い感受性を与えることになる。これに対し、 $\alpha_w$  0.53 以下ではDNA鎖切断のために二量体生成に必要な塩基の重なり合いかが得られず、他の未知の光生成物が損傷の大部分を占めるようになる。その結果、光回復は起こらず、暗回復を起こらないがあるいはその修復効率が低下するために紫外線感受性が著しく高くなるのではないかと考えられる。

乾燥程度によって影響を受けるもう一つの生物的効果は乾燥による突然変異の誘発である。<sup>11, 24)</sup>  $\alpha_w$  0.75 以上と  $\alpha_w$  0.53 以下では誘発頻度が大きく異なり、DNA鎖切断の傾向とよく一致している。従って、DNA鎖切断と突然変異の誘発との間に密接な関係があるのではないかと想されるが、その詳細は第2章で述べることにした。

本章で観察されたDNA鎖切断は、乾燥程度だけでなく乾燥速度によっても影響を受けないのか、あるいは本章で使用した乾燥法のよ

うに急速な乾燥に特異的な現象ではないのか  
といふ可能性を考えられる。しかし、保護物  
質の添加やより低温での乾燥により乾燥速度  
を下げた場合でも、DNA鎖切断は同様に観察  
されることがある(第3章での結果)、乾燥終了まで  
に長時間必要とする凍結乾燥によつてもDNA  
鎖切断は起こること、あるいは酵母のアデニ  
ン要求性変化は常圧乾燥でも真空乾燥と同程  
度にみられることがわから、この可能性を考  
えるのは困難と思われる。  
<sup>24)</sup>

次に本章で問題としたのはDNA鎖切断が乾  
燥過程で生じているのか否かである。乾燥過程  
以外にDNA鎖切断が生じる可能性があるのは  
酸素との接触を伴なう乾燥終了後のデシケ  
ーター内への空気導入時、浸透圧ショックを伴  
なう復水時、あるいは酵素作用が起こり得る  
復水およびその後の超遠心分離用試料の調製  
時である。

<sup>26)</sup>  
この問題についてAshwood-Smithらは凍結乾  
燥したE.coliを復水後、37°Cで振盪培養する

と乾燥直後よりも著しく DNA 鎮切断が増加する事実から、乾燥過程でよりもむしろ乾燥により遊離あるいは活性化した DNA 分解酵素が復水時に関与する可能性の方が大きいと主張している。しかし、本章で用いたアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法では復水後、スフェロプロスト調製をせずに直ちにアルカリで溶菌して超遠心分離を行なったこと、復水温度を変えても DNA 鎮切断に影響しないこと(Table 1), あるいは復水後に増殖培地中で振盪培養(37 °C で 90 分以内)すると, Ashwood-Smith らの結果とは異なり, 切断した DNA 鎮の再結合がみられる(第2章)から彼らの考え方を受け入れるのは困難である。Ashwood-Smith らの実験の場合, 復水後の振盪培養を増殖に用いた合成培地の代りに BHI (Brain Heart Infusion) 培地中で行なっていふ。のために切断した DNA 鎮は再結合せず、逆に一層低分子化されたのではないかと思われる。

一方、復水時の浸透圧ショックや空気導入時

の酸素毒性の可能性も Table 1 の結果から除外される。従って、DNA 鎮切断は乾燥過程で生じたものであると結論した。

本章で最後に問題としたのは何故、乾燥過程で DNA 鎮が切断されたのかについてである。何らかの化学的あるいは生化学的な反応か細胞の乾燥過程で起こったためではないかといふ可能性がますます考えられる。生物試料の乾燥過程で生じる化学反応として知られてゐるのはアミノカルボニル反応である。しかし、この反応は  $a_w$  0.8 から  $a_w$  0.4 付近で最大になり、 $a_w$  依存性を示さないことから DNA 鎮切断との関連は非常に少ないとと思われる。また、乾燥過程中での酵素反応の可能性を DNA 鎮切断が起こるような低い  $a_w$  では考えにくい。そこで次のような仮説が以下の理由により導かれた。

細胞の乾燥が進むにつれて正常な DNA 構造 (B型) の維持に寄与している不凍水が奪われる結果、DNA は B型から無秩序型 (A型) へと

構造変化を起こすようになる。この構造変化の際、DNAは細胞膜と部分的に連結しているために強い物理的なストレスを受けて切断されるに至ったのではないかと考えられる。Koga<sup>40)</sup>

らは乾燥酵母の物性(誘電率および広帯NMRのシグナル強度)が含水率10%付近(湿量基準)<sup>41)</sup>で著しく変化することを見出している。根井ら<sup>42)</sup>も熱測定から、E.coliの不凍水分量は18%(乾物重量当たり)であると報告している。これら の含水率を等温吸着曲線でみた場合、いずれも $a_w$ 0.75付近に相当し、本章で示したcritical  $a_w$ の値とほぼ一致している。

critical  $a_w$ の定義から、細胞がcritical  $a_w$ 以下になるとまで乾燥されると凍結水だけではなく不凍水まで除かれるようになる。不凍水は細胞内でDNAなどの生体高分子の水和水として存在し、構造維持に貢献していると考えられて<sup>3)</sup>いる。従って、乾燥によりDNAなどの高分子の構造が變化し始めることが予想される。実際、DNAでは $a_w$ 0.75、すなわちcritical

$C_w$  以下になると水和水が除去される結果、正常な構造 (B型) の安定性の主因となつてゐる塩基の重なり合い (base stacking) が失なわれて無秩序型 (A型) の構造に変化し始めること <sup>47)</sup> が in vitro の実験で示されてゐる。

しかし、in vitro での結果を in vivo に適用でもうるとしても、構造変化の結果として生じる DNA 損傷は in vivo での方が in vitro での場合よりも大きなものになるのではないかと思われる。何故なら、in vivo では DNA は細胞内で遊離して存在するのではなく部分的に細胞膜と連結しているために、構造変化の際に DNA が受けける物理的なストレスは in vitro に比べて非常に大きくなると推定されるからである。この物理的なストレスの大小が、in vitro では今光学的にみる限り可逆的な構造変化で <sup>48)</sup> あるのに対し、in vivo では不可逆的な DNA 鎮切断という DNA 損傷の相異の原因となつてゐるものと考えられる。

ここで提案した仮説は細胞膜をもつ他の微

生物と異なり、細菌ファージでは何故、乾燥による突然変異が誘発されないのかという疑問に答えられるという利点をもつてゐる。今後、DNAと細胞膜の複合体を用いた in vitro の実験により、この仮説の是非をさらに検討する必要があると思われる。

## 第5節 要約

E. coli を疎水性フィルター上に沪過捕集後、種々の水蒸気圧下で細胞の  $a_w$  を制御しながら乾燥を行なつた。DNA修復能を欠損する突然変異株は  $a_w$  0.53 以下では親株に比べて著しく高い感受性を示すのに対し、 $a_w$  0.75 以上では親株と同程度の感受性しか示さなかつた。

アルカリ性ショ糖密度勾配遠心法により、DNAの1本鎖切断が  $a_w$  0.75 以上では起こらないのに対し、 $a_w$  0.53 以下になつて始めて生じることが確かめられ、感受性の比較から得られた結果と一致した。B. subtilis の栄養細胞でも E. coli と同様の  $a_w$  と DNA 鎮切断の関係が認め

られた。以上の結果は復水培地の組成、浸透圧、あるいは温度によって影響されなかつた。また、乾燥終了後の空気導入および復水時ににおける酸素の有無にも影響されなかつた。

一方、E.coli を  $a_w$  0.75 以下にならまでも乾燥すると、凍結水だけでなく不凍水までも細胞から除かれ始めることが走査型示差熱量計により見出された。従って、乾燥によるE.coli の DNA 鎮切断は不凍水の除去が引き金であると考えられる。

## 第2章 乾燥による Escherichia coli の 突然変異誘発

### 第1節 緒言

乾燥による突然変異の誘発は基礎的にも応用的にも重要な現象である。この現象が菌株や乾燥方法に関係なく起こることはこれまでの研究から明らかにされていいる。しかし、その原因や機構については凍結乾燥法で行なわれた簡単な報告があるのみで、詳細な研究は行なわれていない。前章で述べた  $a_w$  に依存して起こる DNA 鎮切断は、この現象の誘発機構を解明する有力な手掛りになる。何故ならば物理的あるいは化学的な処理により誘発される微生物の突然変異は、一般に、DNA に生じた損傷が修復される過程での修復誤りから起こると考えられているからである。

本章では DNA 鎮切断と突然変異誘発の関係を明らかにすることを目的として、argF アンバーチェニル株の野生型表現型への復帰変異を指

標として修復機構の検討を行ない、DNA鎖切  
断か野生型 rec 遺伝子支配で修復される過程  
での誤りにより突然変異が誘発されるこの結  
果を得た。

## 第2節 実験材料および方法

供試菌 突然変異誘発と DNA 修復の関係  
を検討するためには、マークーとする突然変  
異のタイプが既知である DNA 修復能欠損株を  
用いての研究が有利である。こうした第1章  
で用いた E. coli AB1157, AB2480 ではマークーと  
する突然変異のタイプが不明である。そこで  
E. coli F3294(argF), F3295(uvrA hcr argF),  
F3296(polA argF) および F3297(recA phr argF)  
を供試菌として用いた。これらの株はもとも  
と Kondo S によって分離され、それぞれ Hr 30R  
(49), HS 30R, O16 および NG 30 と命名されたもので  
あり、そのアルギニン要求性は argF locus で  
(52) のアンバーナンセンス変異によるものである。  
本章で用いたこれらの菌株は发酵研究所

飯島貞二所長より供与されたものである。

修復機構の検討には上記の菌株以外に、第1章で用いた E. coli AB1157 とその突然変異株である AB1886 (AB1157 uvrA), AB2470 (AB1157 recB), AB2463 (AB1157 recA), AB2480 (AB1157 uvrA recA), W3110 (thy) および P3478 (W3110 polA) を供試菌として用いた。これらの菌株は大阪大学医学部 近藤宗平教授より供与されたものである。arg, thy はそれぞれ arginine および thymine 要求性突然変異遺伝子を示し, uvr と rec については第1章第2節で述べた。また, hcr 突然変異は宿主回復能を, pol 突然変異は DNA ポリメラーゼ活性を, そして phr 突然変異は光回復能をそれぞれ低下させる。

乾燥処理による突然変異誘発の測定 本章で調べた突然変異はアルキニン要求性から非要求性への復帰突然変異であり, その測定<sup>53)</sup>は Witkin および Kondo らの方法によった。試料調製および乾燥処理は特に断わらなければ限り, 第1章第2節で述べた方法で行なった。

ます、あらかじめアルギニン要求性の单一コロニーとして分離した供試菌を nutrient broth (Difco nutrient broth 8g/l, NaCl 4g/l, pH 7.0) 中で 20 時間、37°C で 培養後、集菌洗浄を行ない  $1/15$  M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で元の容量にした。次に 37°C で 1 時間、懸濁液を振盪し飢餓を行なった後、集菌し細胞濃度を約 5 倍とした。その後、この細胞懸濁液 (約  $5 \times 10^9$ /ml) 2 ml を疎水性フィルター (Millipore FGLP 02500, 直径 25 mm) 上に沪過捕集し、乾燥処理を行なった。ただし、RH 33% の乾燥は  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  の代りに  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を使用した。他の RH の乾燥は第 1 章で用いた方法で行なった。乾燥終了後、3 ml の  $1/15$  M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で復水し、さらに遠心分離により 1 ml に濃縮し原液 (約  $1 \times 10^{10}$ /ml) とした。未乾燥試料は同じリン酸緩衝液 3 ml で復水、懸濁したのを原液 (約  $3 \times 10^9$ /ml) とした。

突然変異頻度および生存率の測定はともに 0.4% glucose, 5% liquid nutrient broth (Difco

nutrient broth ( $8\text{ g/l}$ ) を 20 倍希釈したものの),  
 0.5% NaCl を 添加した最小 E 培地からなる 5%  
 半栄養寒天培地(以下, 5% SEM 寒天培地と略す)上で行なった。ただし, 突然変異頻度の測定には 1 ml の原液より 0.2 ml づつ, 生存率の測定には原液を希釈後, 0.1 ml づつ 5% SEM 寒天培地上に塗布した。寒天平板は 2 日間  $37^{\circ}\text{C}$  で培養を行ない, アルギニン要求性および非要求性コロニーを数えた。5% SEM 寒天培地上においてアルギニン要求性コロニーは非常に小さく, 大きなアルギニン非要求性コロニーと容易に識別できた。

測定は別々に 4 回繰り返して行ない, 誘発の有無は乾燥および未乾燥試料のアルギニン非要求性コロニー数の差に対する t-検定(危険率 5%) より判定した。突然変異の頻度は Kondo (49) の方法にならひ,  $(D-C)/(A \times B)$  の式(ただし, D, C は各々乾燥および未乾燥試料における % レート 1 枚当たりのアルギニン非要求性コロニー数である。A は乾燥前試料の % レート

1枚当たりの生存菌数であり、Bは乾燥後試料の生存率である)より求めた。この場合、1回前の分裂以後は乾燥の有無に関係なく同じ頻度で自然変異が誘発されると仮定すれば、この式から導かれるのは乾燥による分裂回数当たりの誘発頻度である。

また、乾燥処理によるアルキニン要求性変化がサブレッサー変異によるのか否かについては、得られた復帰株に対しアンバー変異を持つT4ファージを感染させ、そのときの溶菌の有無により判定した。

DNA修復能欠損株の乾燥処理後の生存率測定

各供試菌を37°Cで20時間、EM-9培地中で好気的に培養後、集菌洗浄し脱イオン水で懸濁した。これより約 $10^9$ 個の細胞を疎水性フィルター(Millipore FGLP 02500、直径25mm)上に沪過捕集後、RH0%の真空デシケーター(五酸化リンとシリカゲルからなる)内に移し、約0.1 Torrまで減圧し、室温下で一定時間、乾燥した。乾燥終了後、3mlの1/15Mリン酸緩衝液

(pH 7.0) で復水、懸濁し、同じ緩衝液で希釈した後、普通寒天培地(ポリペプトン 1%, 肉エキス 0.5%, NaCl 0.2% および粉末寒天 1%, pH 7.0)上に塗布した。コロニー数の測定は 37°C で 24 時間培養後行なった。

乾燥処理後の DNA 分解の測定 各供試菌の培養から乾燥処理までは上で述べた生存率測定の場合と同じである。ただし、細胞を  $^{3}\text{H}$ -thymidine で標識するためには、EM-9 培地に  $6\mu\text{Ci}/\text{ml}$  の (methyl- $^{3}\text{H}$ ) thymidine (24 Ci/mmol; the Radio-chemical Centre, Amersham, England) と 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 2'-deoxyadenosine (Sigma) を添加したものを利用した。乾燥終了後、直ちに  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  の非放射性 thymidine を含む 2 ml の EM-9 培地で復水し、37°C で振温培養を行なった。一定時間ごとに 0.1 ml の試料をとり、円形沪紙 (Whatman, No. 3, 直径 22 mm) 上にのせて吸収させた。得られた沪紙は赤外線ランプで充分乾燥後、4°C に冷却した 5% trichloroacetic acid で 2 回、さらに acetone (4°C) で 1 回洗浄した。再化

乾燥後、各沢紙の放射活性を第1章で述べた方法により測定した。

切断したDNA鎖の再結合能の測定 供試菌の培養から試料の採取までは上記述べた乾燥処理後のDNA分解の測定と同じである。得られた試料について、既に第1章で述べたアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法により再結合能の程度を測定した。ただし、再結合したDNA区分の高い放射活性を得るために、超遠心分離の前に行なう試料のEDTA処理については試料0.1mlに対し、0.01mlの1%EDTAを加えるように変更した。

### 第3節 実験結果

#### 1. 細胞内水分と突然変異誘発

前章では、E.coli を  $\text{aw}$  0.53以下になると乾燥すると、DNA鎖切断が起こり始めるこを見出した。本章では、このDNA鎖切断が乾燥による突然変異誘発の原因となつてゐるのではないかと考え、これを証明する目的で実

験を行なった。

調べた突然変異はアルギニン要求性から非要求性への復帰突然変異であり、予備実験で次の二点を検討した。すなわち、乾燥処理で得たアルギニン非要求性菌株の各コロニーは継代培養しても表現型は安定であり、乾燥処理による要求性変化は代謝障害などに基づく一過性のものではないことを確かめた。また、この変異がサブレッサー変異によるのか否かについては、 $a_w 0$ で生じた100個のアルギニン非要求性コロニーについて3回繰り返して測定した結果、約40%がサブレッサー変異によるものであり、残りはその他の原因によることが認められた。

まず、 $a_w$ と突然変異誘発の関係をTable 3に示した。未乾燥試料の場合、アルギニン非要求性のコロニー数はプレート1枚当たり、18±11であり、この数は1枚のプレートに塗布する菌数が $10^7$ から $10^9$ の範囲ではほぼ一定であった。通常、1枚の5%SEMプレート上では約

TABLE 3. Induction of mutation ( $\text{arg} \rightarrow \text{arg}^+$ ) by drying of *E. coli* F3294 to various  $a_w$ 

$a_w^a$	Expt no. <sup>b</sup>	Initial bacteria per plate <sup>c</sup> ( $\times 10^8$ )	Survival fraction in dried bacteria (B) (%)	Revertant colonies per plate			Frequency of induced mutation <sup>f</sup> ( $(D - C)/(A \times B)$ ) ( $\times 10^{-8}$ )
				Control <sup>d</sup> (C)	Dried <sup>e</sup> (D)	Difference <sup>f</sup> (D - C)	
0	1	8.4	19	12	83		
	2	9.0	30	11	94		
	3	12	24	38	118	75 ± 9.3**	28 ± 16
	4	21	42	13	76		
0.33	1	23	36	11	104		
	2	17	31	31	128	88 ± 16**	13 ± 3.7
	3	21	35	8.5	108		
	4	19	30	14	79		
0.53	1	23	40	11	36		
	2	18	78	22	57	34 ± 15**	6.5 ± 7.8
	3	19	46	14	34		
	4	10	30	38	92		
0.75	1	23	43	11	22		
	2	16	89	12	23	6.7 ± 4.6	
	3	19	48	15	16		
	4	10	58	38	43		
0.85	1	11	65	6.0	17		
	2	17	89	9.0	12	4.0 ± 5.0	
	3	19	57	14	13		
	4	10	74	38	40		

<sup>a</sup> Bacteria were dried at corresponding RHs for 12 min.<sup>b</sup> Four numbered experiments were conducted independently of each other.<sup>c</sup> The initial number of nondried bacteria per plate. The number of survivors of dried bacteria is equal to A × B per plate. The value represents an average of duplicate scores of colonies on 5% SEM agar.<sup>d</sup> The average of duplicate or triplicate scores of the number of revertant colonies on 5% SEM agar.<sup>e</sup> The average and the standard deviation of difference in every set of paired data. \*\*, The difference is significant at  $P < 0.05$  by Student's *t* test.<sup>f</sup> The average and the standard deviation, indicating mutation frequency at the first division of a dried bacterium.

49)

10<sup>10</sup>個まで増殖することが既に知られている。  
 従って、1枚のプレート上で分裂回数の総和を10<sup>10</sup>回と仮定すれば、自然突然変異の頻度は分裂回数当たり 18 ± 11 × 10<sup>-10</sup>となる。一方,  
 $a_w$  0.75まで乾燥した場合、アルギニン非要求性コロニーの数は未乾燥の場合とほぼ同じであり、一検定(危険率 5%)の結果から突然変異の誘発は認められなかった。これに対して

$a_w$  0.53 以下になるまで乾燥した場合、突然変異の誘発は顕著に認められ、その頻度は  $a_w$  の低下とともに増大する傾向を示した。最大の誘発頻度は  $a_w$  0 の  $28 \times 10^8$  である。この結果を分裂回数当たりの誘発頻度みると、乾燥処理は自然、突然変異の約 100 倍の頻度で変異を誘発することを示している。

以上の結果、乾燥による突然変異誘発およぶ前章で述べた DNA 鎮切断はともに  $a_w$  0.75 以上では起らぬ、 $a_w$  0.53 以下のみ認められた。従って DNA 鎮切断は突然変異の誘発と密接に関係していることが示唆された。

## 2. 乾燥感受性と DNA 修復能

紫外線、X 線あるいはアルキル化剤により誘発される細菌の突然変異は、ある特定の修復機構による DNA 損傷の修復誤りの結果と考えられる。<sup>(49, 51)</sup> 従って、乾燥処理による突然変異の誘発機構を明らかにするためには、DNA 損傷のタイプとその修復機構を知ることが必要である。そのためには、種々の DNA 修復能欠

損株の乾燥感受性の比較を行なった。Fig.7にその結果を示した。

uvrA 突然変異株(AB 1886)と polA 突然変異株(P3478)は親株とほぼ同程度の乾燥感受性であるのに対し、  
recB 突然変異株(AB 2470), recA 突然変異株(AB 2463)および uvrA recA 突然変異株(AB 2480)ではいすれぞ

親株に比べて乾燥感受性は高くあり、uvrA recA 突然変異株(AB 2480)で最高の乾燥感受性が認められた。uvrA recA 突然変異株(AB 2480)よりも高い乾燥感受性を示す理由は不明であるが、同様の結果は乾燥処理と同じDNA鎖切断を引き起こすX線照射の場合にも認められている。この結果から、乾燥感受性は recB, recA の rec 突然変異に強く依

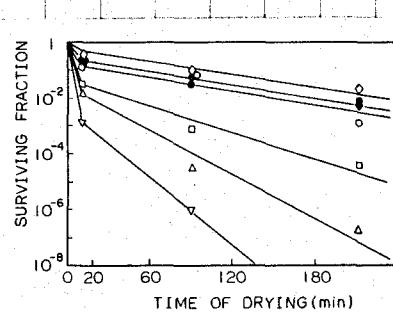


FIG. 7. Survival of DNA repair-deficient mutants of *E. coli* K-12 in the course of drying. About  $10^9$  bacteria were mounted on a hydrophobic filter membrane, dried at an RH of 0% in vacuo, and rehydrated with 0.03 M tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloride buffer solution (pH 8.0). After appropriate dilution, bacteria were plated on nutrient agar, incubated for about 24 h at 37°C, and scored for the number of visible colonies. Each value is an average of duplicate or triplicate determinations; counting errors in the scores were less than 30%. Symbols: ●, AB1157 (the wild-type); ○, AB1886 (uvrA); □, AB2470(recB); △, AB2463(recA); ▽, AB2480(uvrArecA); ◆, W3110 (the wild-type of P3478); ◇, P3478(polA).

存し、uvrA 突然変異や polA 突然変異には関係していな。従って、野生型 rec 遺伝子に支配される修復が乾燥感受性に重要な役割を果たしていることが予想される。

もう一つの注目すべき点は、uvrA 突然変異株(AB1886)の乾燥感受性の程度から乾燥によるDNA損傷の機構を推定できることである。DNA損傷はその修復の段階で除去を必要とするものとしないものとに分けることができる。前者の損傷としてはピリミジン二量体や相補的なDNA鎖間の架橋などが知られているが、後者(54)の損傷としてはDNA鎖切断が報告されているだけである。uvrA 突然変異株ではDNAの損傷部位が除去修復されないのに、もしuvrA 突然変異株が高い乾燥感受性を示す場合には除去を必要とする損傷か、低い乾燥感受性を示す場合には除去不要性の損傷かDNAに生じているとみなすことができる。

Fig.7に示したuvrA 突然変異株(AB1886)の低い乾燥感受性から、乾燥によるDNA損傷は除去

不要性であり、DNA鎖切斷が主であると考えられる。この結果は、除去を必要とするDNA損傷に特異的な現象として知られる液体保持回復が凍結乾燥した E. coli では観察されない<sup>31)</sup>ことからも支持される。

### 3. 乾燥後の再培養によるDNA分解とDNA修復能

乾燥感受性の比較から修復には野生型 rec 遺伝子が関与することが示唆されたので、これを確かめるために同じ一連の突然変異株を用いて以下の検討を行なった。

まず各突然変異株を乾燥後、増殖培地中で再び培養した時に起るDNAの冷酸可溶性区分への分解を調べた。得られた結果をFig. 8に示した。

培養開始後150分以内

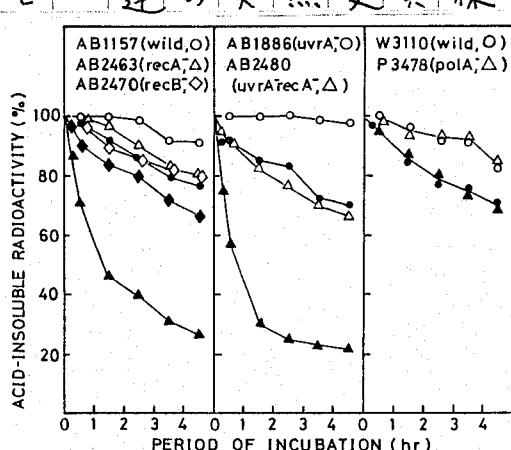


FIG. 8. Degradation of DNA during the incubation of various mutants of *E. coli* K-12 after drying. [<sup>3</sup>H]thymidine-labeled bacteria (ca. 10<sup>8</sup>) were mounted on a hydrophobic filter membrane, dried at an RH of 0% in vacuo for 12 min, rehydrated with EM-9 medium containing 100 µg of nonradioactive thymidine per ml, and then reincubated aerobically at 37°C. At intervals samples were withdrawn, and the cold trichloroacetic acid-insoluble radioactivity was counted. The radioactivities are expressed as percentages of those in bacteria before the incubation. Solid and open symbols indicate responses of dried and nondried bacteria, respectively. Symbols for the strains are at the top of the figure.

に著しい DNA 分解がみられたのは recA 突然変異株 (AB2463) と uvrA recA 突然変異株 (AB2480) である。これに対し、他の突然変異株では親株の場合と同程度あるいは若干、高程度であった。recB 突然変異株 (AB2470) の場合を除くと、この傾向は乾燥感受性の結果とほぼ一致している。recB 突然変異株 (AB2470) はその乾燥感受性から予想されるほどの DNA 分解を示さなかったが、<sup>55)</sup> 同様の結果は紫外線あるいは X 線照射の場合に報告されている。この理由としては recB 突然変異株で欠損している exonuclease V が DNA 分解に関与する可能性が考えられる。

一方、uvrA recA 突然変異株 (AB2480) および recA 突然変異株 (AB2463) で起こる著しい DNA 分解は、乾燥によって生じた DNA 鎮切断が修復されないことを反映しているのではないかと推定される。そこで次にこの可能性を同じ実験条件下でアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法により検討した。

#### 4. DNA 鎮切断の再結合修復

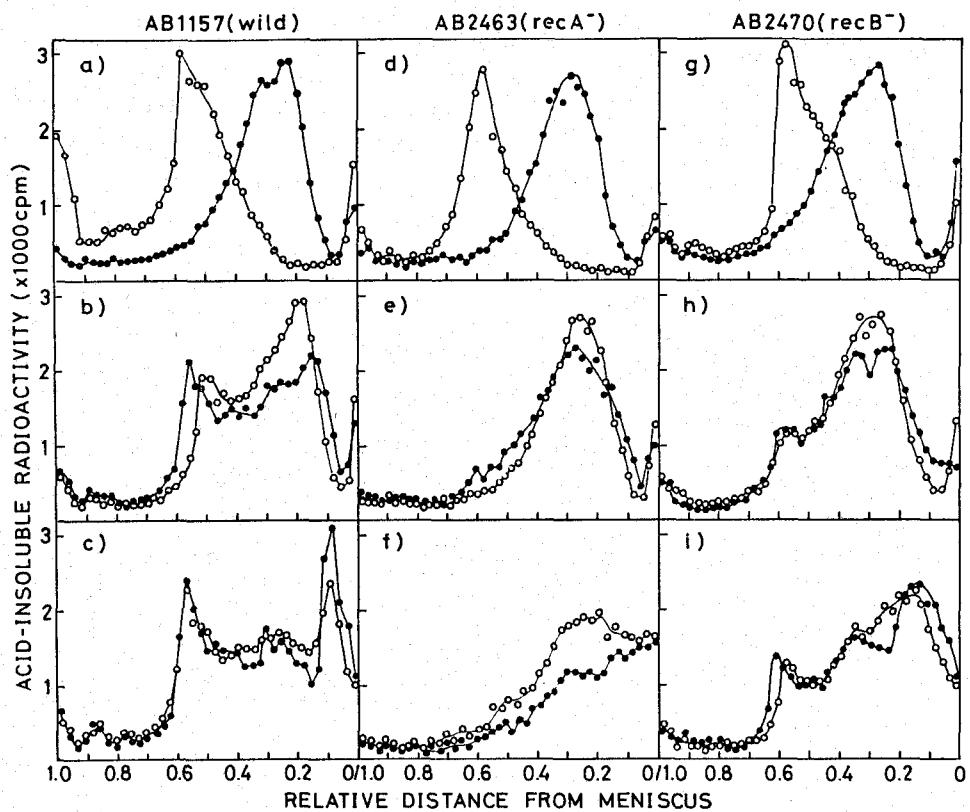


Fig. 9. Sedimentation patterns of DNA from dried and reincubated *E. coli* K-12 AB1157 (wild type [a to c]), AB2463 (*recA* [d to f]), and AB2470 (*recB* [g to i]).  $^3\text{H}$ -labeled bacteria (ca.  $10^9$ ) were mounted on a hydrophobic filter membrane, dried at an RH of 0% in vacuo for 12 min, rehydrated with EM-9 medium containing 100  $\mu\text{g}$  of nonradioactive thymidine per ml, and then reincubated aerobically at 37°C. At intervals, samples were withdrawn and directly lysed on the top of an alkaline sucrose gradient without spheroplast formation and then centrifuged as described in the text. The direction of sedimentation is from right to left. (a, d, and g) The responses of nondried bacteria (open symbols) and dried bacteria without reincubation (closed symbols); (b, e, and h) the responses of dried bacteria reincubated for 30 min (open symbols) and for 90 min (closed symbols); (c, f, and i) the responses of dried bacteria reincubated for 120 min (open symbols) and for 150 min (closed symbols).

乾燥により切断したDNA鎖の再結合について各突然変異株で得られた結果をFig.9およびFig.10に示した。乾燥直後のDNAの相対的な沈降距離は、いずれの突然変異株も親株とほぼ同じ0.34か50.40であった。すなわち、*E.coli*を同じ $a_w$ になるまで乾燥すれば、DNA鎖切断

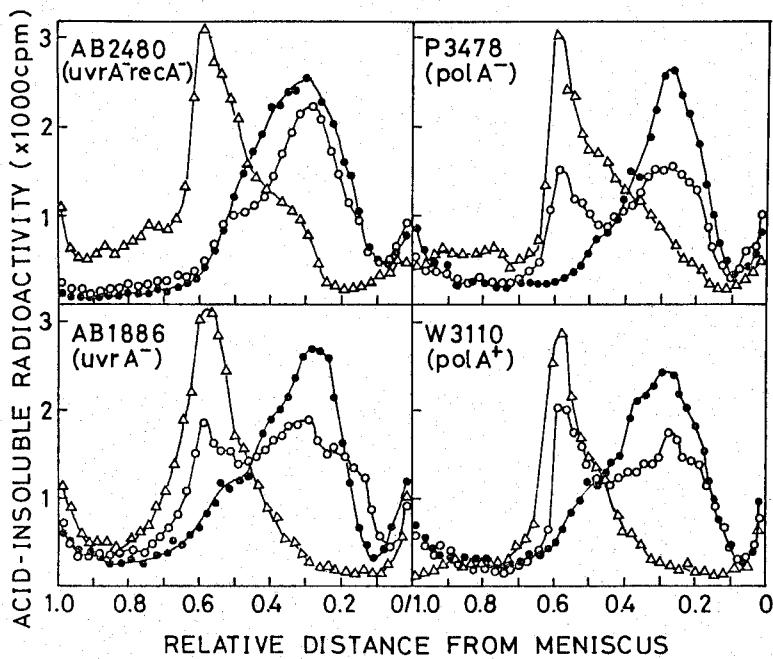


Fig. 10. Sedimentation patterns of DNA from dried and reincubated *E. coli* K-12 AB2480(*uvrA recA*<sup>-</sup>), P3478(*polA*<sup>-</sup>), AB1886(*uvrA*<sup>-</sup>), and W3110 (wild type). The experimental procedures were the same as those described in the legend to Fig. 9. The direction of sedimentation is from right to left. Symbols:  $\Delta$ , nondried bacteria;  $\bullet$ , dried bacteria without reincubation;  $\circ$ , dried bacteria reincubated for 90 min.

は菌株に関係なく同じ程度に起こることを示してい。しかし、その修復能力は遺伝子型によって著しく異なっていることが認められた。

親株(AB1157)の場合、乾燥後にEM-9培地中で再び培養すると90分以内に切断したDNA鎖の一部が再結合し(Fig. 9(a)および9(b)),さらに培養を続けると再結合されなかつた残りのDNA鎖が徐々に分解されていく傾向が観察された。

(Fig. 9(c)). recA 突然変異株(AB2463)では親株とは対照的に、切断したDNA鎖は再培養を行なっても全く再結合されなかつた(Fig. 9(d), 9(e)および9(f))。

組換え能を完全に欠失している recA 突然変異株(AB2463)と異なり、少なくとも数%の組換え能が残っている recB 突然変異株(AB2470)では若干の再結合が認められた(Fig. 9(g), 9(h)および9(i))。親株での再結合は90分以内にほぼ完了すること(Fig. 9(b))から、他の突然変異株の再結合能については90分の再培養の結果から検討した。uvrA 突然変異株(AB1886)と polA 突然変異株(P3478)ではそれぞれの親株(AB1157およびW3110)とほぼ同程度の再結合がみられたが、uvrArecA 突然変異株(AB2480)では全く認められなかつた(Fig. 10)。

X線により切断されたDNA鎖は、野生型 polA 遺伝子に依存する修復機構によりリン酸緩衝液中で再結合されることが報告されている<sup>51)</sup>。そこで、 $1/15\text{M}$  リン酸緩衝液(pH 7.0)中の

再結合の可能性について

して同様の検討を行

なった。しかし, pol A

突然変異株(P3478)の

低い乾燥感受性(Fig.7)

から予想されるよう

に全く再結合は観察

されなかった(Fig.11)。

以上の結果はFig.7

で示した乾燥感受性

の結果とよく一致し

ている。従って、各

突然変異株の乾燥感

受性は生じたDNA鎖

切断の程度によるものではなく、その後の修復

の程度によって決まるることは明らかである。

また、再結合に要する培地、時間およぶ関係

する遺伝子からみて、<sup>58,59)</sup>

の修復には Townsにより Type III とよばれる修

復機構が働いていると考えられる。このType III

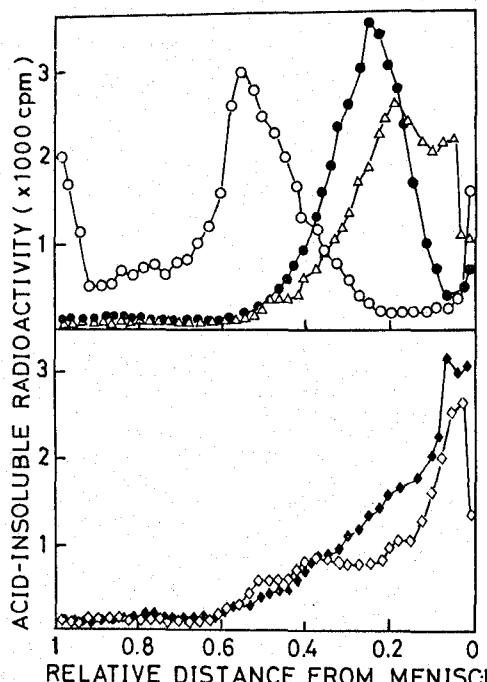


FIG. 11. Sedimentation patterns of DNA from dried and reincubated *E. coli* K-12 AB1157 with a phosphate buffer solution. Procedures were essentially as described in the legend to Fig. 9.  $^3\text{H}$ -labeled bacteria were dried at an RH of 0% in vacuo for 12 min, reincubated aerobically in 0.05 M phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 100  $\mu\text{g}$  of nonradioactive thymidine per ml at 37°C for indicated times, and analyzed on alkaline sucrose gradients. The direction of sedimentation is from right to left. Symbols: ○, nondried bacteria; ●, dried bacteria without reincubation; dried bacteria reincubated with the buffer solution for 15 min (△), 30 min (◆), and 90 min (◇).

修復は突然変異の原因となる修復誤りを引き  
起こす可能性のある修復機構の一つである。  
18, 51)

乾燥による突然変異の誘発も、野生型 rec 遺伝子に依存する Type III 修復での修復誤りとして起こったのではないかと推定される。そこで次の検討を行なった。

### 5. DNA 修復能と突然変異誘発

ここで調べたのは種々の DNA 修復能を欠損する突然変異株の argF アンバー変異によるアルギニン要求性から非要求性への復帰突然変異についてである。乾燥は最も多くのアルギニン非要求性コロニーを与える  $aw = 0.33$  (Table 3) になるまで行ない、得られた結果を Table 4 に示した。組換え能が完全に消失し、野生型 rec 遺伝子に依存する修復が全く起こらない recA 突然変異株 (F3297) の場合、アルギニン非要求性コロニーの数は非常に少なく、 $t$ -検定 (危険率 5%) の結果から突然変異の誘発は認められなかった。これに対し、uvrA 突然変異株 (F3295) および polA 突然変異株 (F3296) での突然

TABLE 4. Induction of mutation by drying of various DNA repair-deficient strains of *E. coli* K-12<sup>a</sup>

Strain	Expt no. <sup>b</sup>	Initial bacteria per plate <sup>c</sup> ( $\times 10^8$ )	Survival fraction in dried bacteria (%)	Revertant colonies per plate			Frequency of induced mutation <sup>f</sup> ( $\times 10^{-5}$ )
				Control <sup>d</sup>	Dried <sup>d</sup>	Difference <sup>e</sup>	
F3294 (wild)	1	23	36	11	104		
	2	17	31	31	128		
	3	21	35	8.5	108	89 ± 15**	14 ± 2.8
	4	19	30	14	79		
F3295 ( <i>uvrA</i> )	1	9.5	58	31	127		
	2	12	38	15	62	78 ± 29**	19 ± 7.7
	3	5.0	68	23	131		
	4	4.4	79	15	74		
F3296 ( <i>polA</i> )	1	22	17	48	86		
	2	5.0	72	39	94		
	3	11	30	35	70	49 ± 15**	11 ± 2.6
	4	26	32	89	155		
F3297 ( <i>recA</i> )	1	3.8	9.2	17	32		
	2	0.33	12	3.0	7.0	7.0 ± 7.0	
	3	2.1	13	2.5	4.5		

<sup>a</sup> Bacteria were dried under an RH of 33% for 12 min.<sup>b</sup>- See footnotes to Table 3.

変異誘発は有意に認められ、その頻度を親株(F3294)とほぼ同じであった。

DNA修復能と乾燥感受性(Fig.7), DNA鎖切断とその修復(Fig.9およびFig.10)については, *E. coli* F3294の親株であるB/r株とその突然変異株でも凍結乾燥法を用いて同様の結果が得られた<sup>31)</sup>。従ってFig.7, Fig.9およびFig.10に示した結果がF3294株とその突然変異株にも適用できることならば、乾燥による突然変異の誘発機構は次のようにな説明される。すなわち,  $a_w$  0.53以下になるとまで乾燥した時に生じたDNA鎖切断に対し、野生型 *rec* 遺伝子に依存する修復

機構が働き、その過程で修復誤りが起つたために突然変異の誘発をもたらしたものと考えられる。

#### 第4節 考察

乾燥による突然変異の誘発について問題となるのは乾燥方法の影響である。誘発の有無は乾燥方法に關係しないことは、疎水性フィルターを担体とする新しい乾燥法を用いた本章での結果(Table 3)からも明らかである。誘発頻度についても、同じ供試菌、同じ測定法による凍結乾燥法での結果と本章での結果(Table 3)とはほぼ一致することから、乾燥方法の影響はないものと思われる。しかし、誘発が起ころのに必要とされる条件は乾燥方法によって異なり、一致した結論は未だ得られていない。

新しい乾燥法では、 $a_w 0.53$ 以下になると細胞を乾燥するだけで突然変異の誘発が観察された。これに対し、L-乾燥法(凍結を伴わな

い) 液状乾燥法) で誘発がみられるのは乾燥菌体を  $10^{\circ}\text{C}$  以上で保存した時だけであり、乾燥直後あるいは  $5^{\circ}\text{C}$  以下の低温で保存した時には認められなかつた。<sup>21, 22)</sup> 酸素の必要性については <sup>26)</sup> E. coli で否定されていふが、酵母の真空乾燥 <sup>24, 25)</sup> の場合には観察されていふ。この問題に関連した他の報告としては、乾燥直後でも誘発は起ころうかその頻度に大きな影響を与える因子として残存水分量を指摘した結果を知られて <sup>60)</sup> いる。Ashwood-Smith らによると、凍結乾燥した E. coli の保存中にみられる誘発頻度の増大は、保存温度に関係なく、ある程度の水分を残した時に起ころうとしている。同様の結果は <sup>61)</sup> エアロゾル乾燥法の場合にも報告されていふ。

このような乾燥方法による相違を本章で得た結果から直接、説明することは非常に困難と思われる。何故なら、他の乾燥法で得られたこれらの結果は DNA レベルでの検討を全く含んでいなひし、また個々の実験条件が同じでないからである。しかし、これらの結果が

乾燥の不均一さや乾燥不充分などによるみかけの現象でないとするならば、基礎的にも実用的にも興味ある以下の可能性が考えられる。

乾燥処理と同じDNA鎖切断を引き起こすX線の場合、嫌気的照射時を除くとDNAに生じたパッチ(切れ目)の長さにより、野生型 polA 遺伝子に依存するType II, 野生型 rec 遺伝子に依存するType IIIの二つの異なる修復機構が働くとみられている。<sup>51, 59)</sup> 短いパッチの場合、主にType IIが働く結果、その修復を緩衝液中でも正確に短時間(数分から10分)で行ない、突然変異の誘発に結びつかない。これに対して長いパッチの場合、修復に増殖培地および長時間(40分から60分)を必要とするType IIIが働き、その過程で修復誤りがあるために突然変異の誘発<sup>18, 49, 51, 59)</sup>が起こるとされている。ここで修復機構の普遍性を考慮し、乾燥処理の場合でもType IIおよびType IIIの二つの修復機構が存在すると仮定すれば、本章での結果(Table 3)と他の乾燥法で得られた結果との相違は次のように説明

が可能になる。

本章の実験で用いた新しい乾燥法の場合、乾燥後の低い生存率 (Fig. 7) あるいは切断した DNA 鎮の再結合がリン酸緩衝液中では全く起こらず (Fig. 11)，増殖培地中でも部分的にしか観察されなかつた (Fig. 9) ことから，細胞には強いストレスが与えられたものと予想される。その結果、長いパッチの DNA 鎮切断が生じ、Type III で修復されるために突然変異の誘発をもたらしたのではないかと考えられる。

21, 22)

60)

これに対し、L-乾燥法や Ashwood-Smith らの凍結乾燥法の場合、乾燥後の高い生存率からみて細胞には比較的弱いストレスが与えられたものと予想される。そのためには、乾燥直後では短いパッチの DNA 鎮切断しか起こらず、主に Type II で修復され、突然変異は誘発されないかあるいは低い頻度でしか誘発されなかつたのではないかと推定される。ところが、一定の温度で残存水分量があると保存中に何らかの二次的な反応が起こり、パッチが乾燥

直後よりも長くなる結果、Type II の代りに Type III が主に働くようになる。その結果、突然変異の誘発をもたらすようになるかあるいはその頻度を増大させるのではないかと考えられる。<sup>24, 25)</sup> ただし、酵母の真空乾燥の場合に主張されていいる酸素の必要性は、酵母に特異的な理由によるのかかもしれない。何故なら、<sup>26)</sup> E.coli では否定されていいるからである。

以上の可能性は未だ推測の域を出るものではないが、突然変異の誘発が起らぬい菌株保存法を確立するためにも今後、さらに検討の必要があると思われる。

## 第5節 要約

E.coli を疎水性フィルター上に沪過捕集し、種々の水蒸気圧下で細胞内の水分活性 ( $a_w$ ) を制御しながら乾燥を行なった。argF アンバー変異株の野生型表現型への復帰突然変異は、 $a_w$  0.75 まで乾燥した時には誘発されなかつた。しかし、 $a_w$  0.53 以下になるとまで乾燥すると

有意な誘発が認められ、既に見出していいる乾燥によるDNA鎖切斷の $\alpha_w$ 依存性と一致した。

種々のDNA修復能欠損株の乾燥感受性を比較した結果、recB, recAおよびuvrArecAの各突然変異株は親株に比べて著しく高い感受性を示したのに對し、uvrAとpolAの各突然変異株はそれぞれの親株と同程度の感受性であった。乾燥によるDNA鎖切斷とその再結合についてアルカリ性シロ糖密度勾配遠心法により検討した結果、切断の程度は菌株のDNA修復能に影響されなかった。しかし、増殖培地中で乾燥後の再培養を行なうとuvrAおよびpolAの各突然変異株はそれぞれの親株とほぼ同程度の再結合を示し、recB突然変異株でも若干の再結合が認められた。これに対し、recAおよびuvrArecAの各突然変異株では全く再結合は観察されず、乾燥感受性の結果と一致した。また、リン酸緩衝液中でも同様の検討を行なつたが増殖培地中でみられた再結合は全く認められなかつた。

一方、乾燥による復帰突然変異は uvrA および polA の各突然変異株では親株とほぼ同程度の頻度で誘発された。しかし、recA 突然変異株では有意な誘発は認められなかつた。従つて突然変異誘発について得た結果が E.coli のいずれの株でも認められるならば、乾燥による突然変異の誘発は DNA 鎮切断か野生型 rec 遺伝子に依存して修復される過程で生じた修復誤りによると考えられる。

## 第3章 乾燥による Escherichia coli の 突然変異誘発の防止

### 第1節 緒言

生命科学の基礎研究や抗生素質などの工業生産に微生物が広範囲に利用されている現在、有用、非有用あるいは病源、非病源を問わず多種多様の微生物をその本来の性質を失なわないよう保存することは非常に重要である。この目的のために様々な方法がこれまでに考案されていり、世界の主要な菌株保存機関(ATCC, NCTC, IFOなど)では維持管理の容易さ、配布手段としての重要さから乾燥処理を主に用いている。<sup>23)</sup> 从って乾燥処理で菌株保存を行なう場合、乾燥方法や菌株に関する認められる突然変異の誘発は大きな問題となってきた<sup>3, 10, 21, 26, 29, 30)</sup>。しかし、突然変異の誘発防止についての報告は少なく、その結果も乾燥方法、菌株あるいは研究者によって必ずしも一致していない。

細菌の場合、エアロゾル乾燥法では myo-inositol  
 3) の添加、L-乾燥法では乾燥後の低温保存が突然変異の誘発を防止すると報告されている。

しかし、凍結乾燥法では誘発防止を認め未報  
 29) 告はなく、脱脂乳や monosodium glutamate の  
 添加、あるいは乾燥後の窒素導入はいずれも無効であった。さらに凍結乾燥によるプロテアーゼの誘発も、myo-inositol や sucrose の添加  
 28) では防止できなかった。一方、酵母の真空乾燥による突然変異の誘発に対して著しい防止効果を示したのは、乾燥直後の窒素ガスあるいは  
 24, 25) 高い RH (75%以上) の水蒸気の導入であった。この兩者に比べて防止効果は劣るが、有効であったのは  $\text{KNO}_2$  や glucose の添加である。

しかし、以上の報告では突然変異の誘発を引き起こす DNA 損傷との関係は全く考慮されていない。前章の結果から、細胞を  $a_w$  0.53 以下になるとまで乾燥した時に起こる DNA 鎮切断が突然変異誘発の原因となる可能性が支持された。従って、乾燥による突然変異の誘発を

防止するには DNA 鎮切斷が起らぬないようにするか、あるいはできるだけその程度を少なくすればよいと考えられる。本章ではアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法により検出した DNA 鎕切斷を指標として、i) 保護物質の添加、ii) 低温での乾燥および iii) 低温凍結処理の効果を検討し、低温凍結処理のみ突然変異の誘発を防止できることの結果を得た。

## 第2節 実験材料および方法

供試菌 供試菌としたのは第2章で用いた E. coli AB1157 および E. coli F3294(argF)である。

乾燥処理による DNA 鎖切斷 第1章で用いた方法により、(methyl-<sup>3</sup>H) thymidine を標識した約  $10^8/\text{ml}$  の E. coli AB1157 の細胞懸濁液を調製した。保護物質として使用した myo-inositol (Sigma), D-glucose (和光純薬) または monosodium glutamate (和光純薬) はこの懸濁液中に 1% ( $\text{w}/\text{v}$ ) あるいは 6% ( $\text{w}/\text{v}$ ) 添加し、完全に溶解後使用し

た。

この細胞懸濁液 1 ml を 98% エタノールに 1 分間浸漬した疎水性フィルター (Millipore FGLP 02500, 直径 25 mm) 上で沪過捕集したものを乾燥用試料とした。この試料を  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  の飽和塩液を含むテシケーター (RH 33%) 内に置き、塩液が室温 (約 20°C) で沸とうするまで減圧にした後、12 分間あるいは 92 分間放置して乾燥試料とした。低温での乾燥処理は、あらかじめ氷水中で冷却したテシケーター内に試料を置き、減圧下で 48 分間あるいは 96 分間行なった。

乾燥終了後、0.03M トリス一塩酸緩衝液 (pH 8.0) 3 ml で復水し、その懸濁細胞の DNA 鎮切断について、第 1 章で用いたアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法により調べた。

低温凍結処理による DNA 鎮切断 上記の (methyl-<sup>3</sup>H) thymidine で標識された E. coli AB1157 細胞懸濁液 ( $10^8/ml$ ) 3 ml を直 径 18 mm 試験管に移し、これを -20°C または -80°C 中で 2 時間凍結保持した。その後、37°C の温水中で急速融

解し、その懸濁細胞のDNA鎖切断について、アルカリ性シヨ糖密度勾配遠心法により調べた。

### 乾燥処理による突然変異誘発の測定 E.coli

F3294 (argF)を供試菌とし、試料調製、乾燥処理、突然変異頻度および生存率の測定は第2章で用いた方法によった。ただし、乾燥条件はRH 33%で12分間または92分間とした。保護物質の添加は、あらかじめ親水性フィルター(Millipore HAWP 04500, 直径45mm)で除菌して使用した以外は上記と同じである。

### 低温凍結処理による突然変異誘発の測定

上記の方法でE.coli F3294 (argF)を培養、集菌、洗浄、飢餓処理後、 $10^8/ml$ の菌濃度に希釈し、その各3mlを試験管中で $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ あるいは $-180^{\circ}\text{C}$ に2時間凍結保持した。その後、 $37^{\circ}\text{C}$ の温水中で急速融解した液を原液とした。突然変異頻度の測定にはその原液0.2mlづつ、生存率測定にはさらに約 $2 \times 10^3/ml$ になるよう希釈後、0.1mlを5%SEM寒天培地上に塗布した。以下の手順は乾燥処理による突

然変異の測定と同じである。

### 第3節 実験結果

#### 1. 保護物質の添加による誘発防止

まず、保護物質の添加効果について検討した。細菌の乾燥に対する保護物質を大別すると、脱脂乳、PVP(ポリビニルピロリドン)などの高分子の物質と、糖、糖アルコール、アミノ酸などの低分子の物質がある。その保護機構から前者は凍結乾燥に、後者は凍結乾燥および真空乾燥に使用されている。<sup>62)</sup>本章で用いた乾燥法は本質的に真空乾燥法であることが、低分子の代表的な保護物質であるmonosodium glutamate, D-glucose, myo-inositolについて検討を行なった。

これらの物質の添加濃度は乾燥による濃縮を考慮して1%(w/v)とし、その懸濁には緩衝液を使用せず脱イオン水を用いた。乾燥は最も多くのアルギニン非要求性コロニーが得られるRH33%(Table 3)で12分間行なった。Fig.12

に乾燥後のDNA鎖切

断について、Table 5

に突然変異頻度の結

果を示した。

Fig. 12からDNA鎖切

断はいずれの保護物

質を添加しても防ぎ

得ないこと、monosodium

glutamateがD-glucose,

myo-inositolに比べて

DNA鎖切断の程度を

減少させることが認め

られる。monosodium

glutamateが何故DNA

鎖の切斷を減少させるかは明らかではない。

第1章で述べた如く同一菌株ではDNA鎖切斷

の程度は直接生存率に反映する(Fig. 2および

Fig. 5)。従来からmonosodium glutamateがmyo-inositolやD-glucoseに比べて乾燥後の生存率

を増大させる効果が大きいことが知られて以

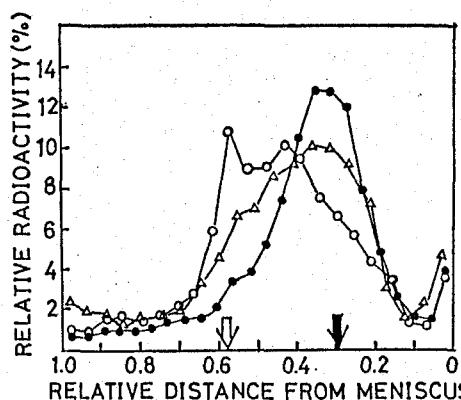


Fig. 12. Sedimentation profile of DNA from dried *E. coli* K-12 AB1157 (wild-type for repairability).

<sup>3</sup>H-Thymidine-labeled cells (about 10<sup>8</sup>) were suspended in the medium containing various protective substances, mounted on a hydrophobic membrane filter, dried at RH 33% for 12 min, and rehydrated with 0.03 M Tris-hydrochloride buffer (pH 8.0). Cells were directly lysed on top of the alkaline sucrose gradient without spheroplast formation and centrifuged as described in the text. The direction of sedimentation is from right to left. The solid and open arrows represent the relative positions of DNA from cells dried without addition of protective substance and not dried, respectively.

Symbols: ○, dried in the medium containing 1% monosodium glutamate; △, dried in the medium containing 1% D-glucose; ●, dried in the medium containing 1% myo-inositol.

Table 5. Effect of suspending medium on the induction of mutation ( $\text{Arg}^-$  to  $\text{Arg}^+$ ) by drying of *E. coli* F 3294.

Suspending medium	Exp. no. <sup>a</sup>	Initial cells per plate <sup>b</sup> (A)	Surviving fraction of dried bacteria (B)	Revertant colonies per plate <sup>c</sup>			Frequency of induced mutation <sup>d</sup> $((D-C)/(A \times B)) \times 10^{-8}$
				Control (C)	Dried (D)	Difference <sup>d</sup> ((D-C))	
Deionized water <sup>f</sup>	1	23	29	24	116		
	2	27	21	36	122	76±20**	12±2.7
	3	18	29	23	71		
	4	25	34	34	113		
1% monosodium glutamate <sup>f</sup>	1	4.7	60	37	72		
	2	3.6	53	5.5	68	59±22**	21±8.6
	3	7.6	58	10.5	89		
	4	27	33	36	82		
1% <i>myo</i> -inositol <sup>f</sup>	2	18	26	23	57		
	3	28	24	16	110	60±27**	11±5.1
	4	25	15	34	102		
	1	23	21	24	127		
1% D-glucose <sup>f</sup>	2	33	24	30	212		
	3	18	33	23	140	129±36**	21±1.2
	4	25	22	34	147		
	1	5.1	71	12	16		
6% <i>myo</i> -inositol <sup>f</sup>	2	5.6	75	27	24		
	3	1.3	73	12	9.5	3.0±7.3	-0.26±1.6
	4	18	60	23	36		
	1	23	25	24	59		
6% <i>myo</i> -inositol <sup>g</sup>	2	33	46	30	85		
	3	23	30	39	69	39±11**	4.6±0.9
	4	25	33	34	69		

<sup>a</sup> Each experiment was conducted independently.

<sup>b</sup> Value indicates the initial number of non-dried bacteria per plate. The number of survivors of dried bacteria is equal to A×B. The values A and B represent averages of duplicate or triplicate counts of colonies on 5% SEM (semi-enriched medium) agar.

<sup>c</sup> Average of duplicate or triplicate counts of revertant colonies on 5% SEM agar.

<sup>d</sup> Average and the standard deviation of difference, D-C, for each pair. (\*\*) indicates the differences are significant at  $P<0.05$  by Student's t-test.

<sup>e</sup> Average and the standard deviation of  $(D-C)/(A \times B)$ , indicating mutation frequency at the first division of a dried bacterium.

<sup>f</sup> Bacteria were dried under RH 33% for 12 min.

<sup>g</sup> Bacteria were dried under RH 33% for 92 min.

63)

るが、Fig.12の結果はこれに矛盾しない。

一方、突然変異の誘発を保護物質の添加で防ぐことはできない(Table 5)。対照試料(脱イオン水で懸濁して乾燥したさの)に比べて、突然変異の誘発頻度は monosodium glutamate 存在下でも減少しないし、D-glucose 存在下では逆に2倍弱増大している。保護物質存在下では乾燥後、かえって誘発頻度が増大することは<sup>26, 27)</sup>凍結乾燥の場合に Ashwood-Smith が指摘している。また、乾燥によるアロファージの誘発においても、保護物質が頻度を高めることが森地らによつて報告されてゐる。その原因は不明であるが、乾燥後の生存率を高める保護物質が乾燥による突然変異誘発を防止できないことは明白である。

しかし、エアロゾル乾燥法では myo-inositol が 5~6% (w/v) 濃度で突然変異誘発を防止する<sup>3)</sup>ことが Webb によつて報告されてゐる。そこでさらに myo-inositol の添加濃度を 1% から 6% に上げて実験を行なつた。Fig.13 に DNA 鎮

切斷について、Table 5

に突然変異誘発についての結果を示した。

DNA鎖切断および

突然変異の誘発は乾

燥時間12分では観察

されないが、乾燥時

間を92分に延長する

といずれも認められ

3)

る。従ってWebbらの

報告とは異なり、myo-

inositolを6%添加し

ても乾燥による突然変異の誘発は防ぎ得ない

ことが確かめられた。この理由としては彼ら

が使用したエアロゾル乾燥法では菌体が、浮

遊する液滴中で濃縮されたmyo-inositolに包み

こまれて乾燥する。その結果、菌体自身の乾

燥がきわめて不充分となるために、突然変異

誘発に対するみかけの防止効果が生じたもの

と考えられる。これに対して本実験では沪過

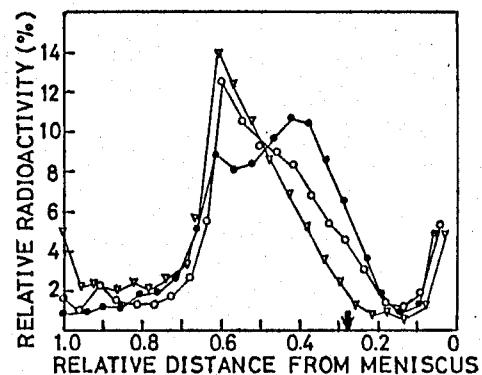


Fig. 13. Sedimentation profile of DNA from dried *E. coli* K-12 AB1157 (wild-type for repairability).

Except for the concentration of protective substance and time of drying, the experimental procedures were as described in Fig. 12. The direction of sedimentation is from right to left. The solid arrow represents the relative position of DNA from cells dried for 12 min without addition of protective substance.

Symbols:  $\nabla$ , not dried;  $\circ$ , dried in the medium containing 6% *myo*-inositol for 12 min;  $\bullet$ , dried in the medium containing 6% *myo*-inositol for 92 min.

により乾燥前に溶液中の myo-inositol は充分除かれ、myo-inositol の菌体に対する付着量はさわめて少なく、菌体の乾燥速度はそれ程影響をうけなかつたものと考えられる。

## 2. 低温乾燥による誘発防止

次に、乾燥による突然変異の誘発を防止する目的で、乾燥時の温度を検討した。これは乾燥温度を下げるにより、脱水に伴つておこる DNA 鎮切断や変異誘発頻度を下げるこれが可能ではないかと考えたからである。この場合、乾燥は  $0^{\circ}\text{C}$

で行ない、乾燥の Q<sub>10</sub>  
(64)

が約 2 であることを

考慮して乾燥時間

室温での 4 倍の 48 分

間とし、さらにその

2 倍の 96 分でも実験

を行なつた。なお、

この実験で使用した

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  の飽和塩

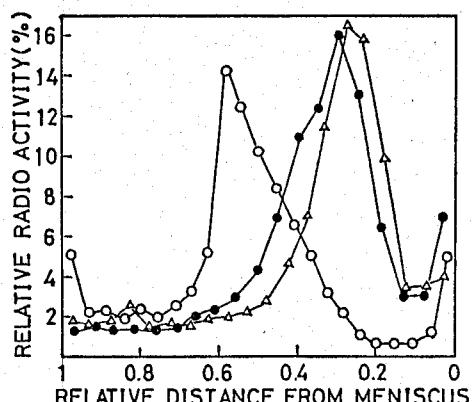


Fig. 14. Sedimentation profile of DNA from dried *E. coli* K-12 AB1157 (wild-type for repairability).

Except for time and temperature of drying, the experimental procedures were as described in Fig. 12. The direction of sedimentation is from right to left.

Symbols: ○, control (not dried); ●, dried at  $0^{\circ}\text{C}$  for 48 min (without addition of protective substance); △, dried at  $0^{\circ}\text{C}$  for 96 min (without addition of protective substance).

Table 6. Induction of mutation (Arg<sup>-</sup> to Arg<sup>+</sup>) by drying of *E. coli* F3294 at 0°C.

Time of drying (min)	Exp. no. <sup>a</sup>	Initial cells ( $\mu$ )	Surviving frac- tion of dried bacteria (B)	Revertant colonies per plate <sup>c</sup>			Frequency of induced mutation <sup>d</sup> (D-C)/(A $\times$ B) $\times 10^{-8}$
				Control (C)	Dried <sup>f</sup> (D)	Difference <sup>d</sup> (D-C)	
48	1	33	23	30	45	30±14**	6.2±3.9
	2	23	30	28	64	36±14**	
	3	23	15	39	78	39±14**	
96	1	33	26	24	62	38±14**	5.6±2.4
	2	23	19	28	43	31±14**	
	3	23	19	17	58	41±14**	

<sup>a, b, c</sup> and <sup>d</sup> cf. Table 5.<sup>d</sup> Average and the standard deviation of difference, D-C, for each. (\*\*) indicates the differences are significant at  $P<0.1$  by Student's t-test.<sup>f</sup> Bacteria were dried under RH 33%.

液のRHは温度による変化が小さく無視できる程度である。  
(65)

実験結果はFig. 14に示すように乾燥温度を下げてもDNA鎖切断は起こり、切断の程度もFig. 12, Fig. 13で示した室温での場合とほとんど同じである。また、乾燥時間を48分から96分に延長してもDNA鎖切断は若干増大する程度であり、48分以内で乾燥は完了し所定のRHと平衡に到達していると推定される。突然変異誘発についての結果(Table 6)はDNA鎖切断度の結果(Fig. 14)から予想されるように、低温での乾燥によっても室温での場合(Table 5)とほぼ同じ頻度で突然変異が誘発されることを示してい

る。

### 3. 低温凍結による誘発防止

次に乾燥と並ぶもう一つの重要な菌株保存手段である低温凍結によるDNA鎖切断および突然変異誘発について検討を行なった。Fig.15に示すように、凍結温度に関係なくDNA鎖切断は全く認められないと、低温凍結による突然変異誘発の頻度上昇は認められない(Table 7)。この結果も含めて低温凍結による突然変異誘発の報告は未だない。

この理由として

は、細胞外凍結(通常

の実験可能な条件で

の凍結は細胞外凍結

となる)によって生じ

る脱水は細胞のもつ

凍結水の範囲でしか

起こらないこと、第

1章で述べたように

凍結水のみの除去、

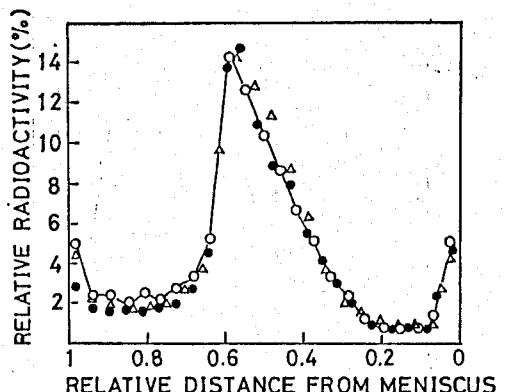


Fig.15. Sedimentation profile of DNA from frozen and thawed *E. coli* K-12 AB1157 (wild-type for repairability).

<sup>3</sup>H-Thymidine-labeled cells were suspended in deionized water ( $10^8/\text{ml}$ ), frozen and kept at  $-20^\circ\text{C}$  or  $-80^\circ\text{C}$  for 2 hr, then thawed immediately at  $37^\circ\text{C}$ . The remaining procedures were as described in Fig.12. The direction of sedimentation is from right to left.

Symbols : ○, control (not frozen); ●, frozen and kept at  $-20^\circ\text{C}$ , then thawed; △, frozen and kept at  $-80^\circ\text{C}$ , then thawed.

Table 7. Effect of freezing and thawing on the induction of mutation ( $\text{Arg}^-$  to  $\text{Arg}^+$ ) of *E. coli* F3294.

Temp. of freezing (°C)	Exp. no. <sup>a</sup>	Initial cells per plate <sup>b</sup> (A)	Surviving fraction of frozen and thawed bacteria (B)	Revertant colonies per plate <sup>c</sup>		
				Control (C)	Frozen and thawed <sup>d</sup> (D)	Difference <sup>e</sup> (D-C)
-20	1	10	16	27	23	$-1.3 \pm 2.5$
	2	12	60	18	17	
	3	11	58	20	21	
-80	1	10	91	27	30	$3 \pm 1$
	2	12	67	18	20	
	3	11	42	20	24	
-180	1	10	91	27	26	$2.3 \pm 3.5$
	2	12	100	18	20	
	3	11	67	20	26	

<sup>a</sup> and <sup>c</sup> cf. Table 5.

<sup>b</sup> Values indicate the initial number of non-frozen bacteria per plate. The number of survivors of frozen and thawed bacteria is equal to A×B. A and B represent the average of duplicate or triplicate counts of colonies on 5% SEM agar.

<sup>d</sup> Frozen and kept at various temperatures for 2 hr, and then thawed immediately at 37°C.

<sup>e</sup> Average and the standard deviation of difference, D-C, for each pair.

すなわち  $Aw$  0.75までの脱水によってはDNA鎖切断が起こらないこと(Fig.3 およびFig.4)を挙げることができる。ただし、対数期の *S. typhymurium*では低温凍結によるDNA損傷が特定の融解条件下で起こることがTakanoらによ<sup>66)</sup>り報告されていいる。従って菌株保存には定常期の菌株を用意し、低温凍結処理を行なうのが最も好ましいと結論した。

菌株保存のための乾燥方法としては凍結乾燥法<sup>26, 29)</sup>、L-乾燥法(凍結を伴わない液状乾燥法)<sup>30)</sup>、真空乾燥法があるが、いずれの場合にも乾燥によつて突然変異が誘発される。ただし、Webb<sup>3)</sup>らの報告を除けばその誘発頻度はUV、X-線、アルキル化剤などに比べて低いことが特徴の一つであった。しかし極く最近、frame-shift型変異によるlac-株では凍結乾燥後、700倍という高頻度で突然変異が誘発されるとの報<sup>60)</sup>告もある。

一般にはDNA損傷が起こるとそれに伴つて突然変異の誘発頻度が増大することが多い。従つて、乾燥による突然変異の誘発を防止するためには、DNA鎖の切断ができるだけ少ない乾燥方法を見出さなくてはならぬ。この面からの研究には、突然変異の誘発頻度に対する大きな影響因子である細胞内水分の制御が可能であり、充分な量の試料が得られ、凍結による影響を除外できる点などから、第一章で述べた疎水性フィルターを担体とする乾燥

法は他の凍結乾燥法などに比べて有利と言える。本章ではこの乾燥法を使用し、以下の可能性を検討した。

保護物質の添加で乾燥によるDNA鎖切断か防げるとするならば、保護物質かDNAの構造維持に寄与する結合水と置換した場合か、あるいは保護物質存在のために乾燥が充分進まなかつた場合のいずれかと考えられる。高分子の保護物質では、細胞内への透過が不可能であるために前者の可能性を除外でき、後者の可能性も10%脱脂乳存在下で凍結乾燥によるDNA鎖切断が生じるとの結果から考えられない。一方、低分子の保護物質として最も期待できるのは、乾燥後の生存率に対して秀れた保護効果を示すmonosodium glutamateとWebb<sup>3)</sup>らの提案しているmyo-inositolである。これらの保護物質について検討した結果(Fig.12, Fig.13)から、保護物質添加によるDNA鎖切断の防止は後者の可能性、すなわち乾燥もののものを妨げた効果によると考えられる。この場合、

乾燥後でも細胞内に酵素反応などが起こるのに充分な水が残り、長期における菌株保存が困難となる可能性がある。また、凍結乾燥の場合でもDNA鎖切断との関係は不明であるが、種々の保護物質を添加しても突然変異の誘発<sup>27, 29)</sup>は防止できないと報告されており、保護物質の添加で突然変異の誘発を完全に防止するのは困難と思われる。

一方、乾燥条件あるいは復水条件を変えることによってDNA鎖切断、突然変異の誘発を防止することが考えられる。しかし、既に乾燥温度(Fig. 14)、乾燥時の圧力、復水速度、復水培地、酸素の有無などに關係なくDNA鎖切断または突然変異の誘発が起こることが認められており、この可能性もほとんど無い。従って、DNA鎖切断および突然変異の誘発を完全に防止することは乾燥処理の場合、現時点では不可能であり、そのためにはFig. 15, Table 7で示したように低温凍結処理によらねばならぬ。

低温凍結処理に弱い菌株、あるいは菌株配布などのために乾燥処理が必要な場合、以下の点に注意すれば乾燥による突然変異の誘発頻度を下げることは期待できる。

i) 乾燥に対する抵抗性の強い Micrococcus radiodurans やグラム陽性細菌の場合、一定の生存率が得られるならば保護物質を添加しないようにする。これは保護物質を添加すると Table 5 で示した結果、あるいは E. coli の凍結乾燥処理では Ashwood-Smith の結果から逆に誘発頻度が高まる可能性があるからである。<sup>26, 27)</sup>

ii) 乾燥に対して抵抗性の弱いグラム陰性細菌の場合、誘発頻度の高い菌株ではたとえ保護効果は劣っても monosodium glutamate の使用を廢し、myo-inositolなどの保護物質を使用するようとする。誘発頻度が低い菌株では monosodium glutamate の使用も可である。

iii) 乾燥後の菌株保存は低温下が良い。乾燥処理の場合、10°C 以上で保存すると突然変異が誘発されるのに対し、5°C 以下で保存す

るとほとんど誘発されないことが坂根らによ  
り報告されてい。る。

iv) 乾燥処理後、菌体を酸素に接触させな  
い

26)

ようにする。E. coliでは認められていないが  
、酵母の真空乾燥処理の場合、酸素に接触さ  
せると著しく突然変異の誘発頻度が高まるこ  
とが知られており、また生存率についても酸  
素の著しい毒性効果がStrangeらにより報告さ  
れているからである。<sup>1)</sup>

24, 25)

D) 一般に乾燥による突然変異の誘発頻度は  
低いために、復水後の増殖で突然変異株の選  
択性濃縮が起こらないようにする。

今後、乾燥による突然変異の誘発を防止す  
るために、野生型 p<sub>o</sub>lA 遺伝子に支配される  
修復機構が働くようにするか、あるいは SOS  
修復機構の発現を押えるようにすることが考  
えられる。

## 第5節 要約

乾燥処理による E. coli の DNA 鎮切断およ

突然変異の誘発を防止するためには、myo-inositol、monosodium glutamate、D-glucoseを保護物質として 1% (w/v) または 6% (w/v) 添加したが完全に防止できなかった。さらに乾燥温度を下げた場合でも同様に防止できなかった。これに対し、低温凍結処理では凍結温度に関係なく DNA 鎮切断および突然変異の誘発は認められなかった。

## 総括

本研究は微生物の乾燥によるDNA損傷の詳細な検討から、細胞致死や突然変異誘発の原因を明らかにすることを目的として実施したものである。この目的のためには、一定量の細胞を急速に所定の程度になるまで乾燥が可能な新しい乾燥法が必要とされた。本研究では E.coli の細胞を薄層状態で疎水性フィルター上に沪過捕集し、種々の水蒸気圧下で減圧乾燥する方法を新たに考案し、この方法により以下の成果が得られた。

第一章では乾燥による E.coli のDNA損傷の有無とその特性について検討した。DNA修復能欠損株とその親株の乾燥感受性の比較、アルカリ性ショ糖密度勾配遠心法によりDNAの1本鎖切断が  $a_w$  0.75以上では起こらないのにに対し、 $a_w$  0.53以下になつて始めて生じることを明らかにした。また、このような  $a_w$  とDNA鎖切断の関係は B.subtilis の栄養細胞でも同様

に認められた。

以上の結果は復水培地の組成、浸透圧あるいは温度によっても影響されないし、乾燥終了後の空気導入および復水時ににおける酸素の有無に關係しなかつた。さらに E.coli を  $a_w$  0.75 以下になるまで乾燥すると、凍結水だけではなく不凍水までも細胞から除かれ始めるこれを走査型示差熱量計により見出した。これらの結果から、乾燥による E.coli の DNA 鎮切断は不凍水の除去が引き金であるとの仮説を得た。

第 2 章では第 1 章で見出した DNA 鎇切断が突然変異誘発の原因であることを証明するためには、修復機構を中心的に検討した。

種々の DNA 修復能欠損株の乾燥感受性を比較した結果、recB, recA および uvrA recA の各突然変異株は親株に比べて著しく高い感受性を示すのに対し、uvrA pola の各突然変異株はそれぞれの親株と同程度の感受性しか示さなかつた。この結果から、乾燥による DNA 損傷は主に DNA 鎇切断であること、乾燥感受性

は野生型 rec 遺伝子支配の修復能に依存する可能性が示された。

この可能性は切断したDNA鎖の再結合能をアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法で調べることにより、確かめられた。すなわち、切断の程度は菌株のDNA修復能に影響されないこと、再結合はリン酸緩衝液中では起こらず、増殖培地中でのみ起こることが認められた。この再結合は uvrA および pola の各突然変異株ではそれぞれの親株と同程度に、recB 突然変異株でも若干、起こるのに対し、recA および uvrA recA の各突然変異株では全く認められなかつた。

一方、アルキニン要求性から非要求性への復帰突然変異は  $a_w$  0.75 以上では誘発されず、 $a_w$  0.53 以下になると始めて有意に誘発され、DNA鎖切断の  $a_w$  依存性と一致した。さうに野生型 rec 遺伝子に依存する修復が全く起こらない recA 突然変異株では復帰突然変異が全く誘発されないのであるのに対し、uvrA および pola の各突然変異株では親株と同程度の頻度で誘発さ

れることを見出した。以上の結果が E.coli のいずれの株でも認められるとすると、乾燥による DNA 鎮切斷は野生型 rec 遺伝子に依存して修復され、その過程で生じた修復誤りが突然変異の誘発を引き起こしたものと考えられる。

第3章では乾燥による E.coli の DNA 鎮切斷と突然変異の誘発を防止するためには、保護物質の添加、低温での乾燥および低温凍結処理の効果について検討した。

保護物質として myo-inositol, monosodium glutamate あるいは D-glucose を 1% (w/v) 添加した場合、DNA 鎮切斷の程度と誘発頻度に対する影響は認められたが、完全に防止できなかった。さらに突然変異の誘発を防止すると報告されていける唯一の例である 6% (w/v) myo-inositol の添加効果についても検討し、その防止効果は乾燥の遅れによるみかけのものであることを DNA 鎮切斷の面から明かにした。

低温での乾燥の効果については 0°C で検討

した結果、DNA鎖切断の程度および誘発頻度はともに常温での場合と変わらないことを認めた。一方、低温凍結処理によるDNA鎖切断および突然変異の誘発は、凍結温度に関係なく全く認められなかつた。従つて、菌株保存は現時点では低温凍結処理によるのが好ましいとの結論を得た。

DNAに対する水の役割についてはこれまで in vitro でしか検討されていなかつたが、新しく乾燥法を考案することにより in vivo での検討が可能になつた。その結果、DNAの構造維持における不凍水の役割を in vivo で始めて指摘し、乾燥によるDNAの構造変化は in vitro と異なり、in vivo では不可逆に起こることを明らかにした。この知見に基づき、菌株保存に際して大きな問題となつてゐる乾燥による突然変異誘発の原因およびその機構を解明することができた。すなわち、細胞内水分活性 ( $a_w$ ) が 0.53 以下になると乾燥するとDNA鎖切断が生じること、その修復は野生型 rec 遺

伝子支配で行なわれること、このときの修復  
誤りが突然変異誘発につながることを明らか  
にした。以上の成果により、菌株保存法の改  
良の基礎を確立することができた。

## 文 献

- 1) Strange, R.E., Cox, C.S. : The Survival of Vegetative Microbes (Gray, T.R.G., Postgate, J.R.), 111, Cambridge Univ. Press (1976).
- 2) 森地：凍結・乾燥と細胞障害（根井編），45，東大出版会（1970）。
- 3) Webb, S. J. : Bound Water in Biological Integrity, 146, Charles C Thomas, Publisher (1965).
- 4) Atkin, L., Moses, W., Gray, P. P. : J. Bacteriol., 57, 575 (1949).
- 5) Subramaniam, M. K., Prahalada-Rao, P. L. : Experientia, 7, 98 (1951).
- 6) Braun, W. : Brucellosis, 29, Amer. Assn. Advanc. (1950).
- 7) Servin-Massieu, M. : J. Bacteriol., 82, 316 (1961).
- 8) Servin-Massieu, M. : Ciencia, 25, 219 (1967).
- 9) Servin-Massieu, M., Cruz-Camarillo, R. : Ap

- pl. Microbiol., 18, 689 (1969).
- 10) Servin-Massieu, M.: Curr. Topics Microbio  
l. Immunol., 54, 119 (1971).
- 11) Webb, S. J.: Nature (London), 213, 1137 (1967  
).
- 12) Webb, S. J., Dumasia, M. D.: Can. J. Microbiol  
, 13, 33 (1967).
- 13) Webb, S. J., Tai, C. C.: Can. J. Microbiol., 14  
, 727 (1968).
- 14) Setlow, R. B., Setlow, J. K.: Proc. Natl. Acad  
. Sci. U. S., 48, 1250 (1962).
- 15) Setlow, R. B., Carrier, W. L.: Proc. Natl. Aca  
d. Sci. U. S., 51, 226 (1964).
- 16) Boyce, R. P., Howard-Flanders, P.: Proc. Nat  
l. Acad. Sci. U. S., 51, 293 (1964).
- 17) Howard-Flanders, P.: Ann. Rev. Biochem., 37  
, 175 (1968).
- 18) 近藤：分子放射線生物学, 98, 東大出版会(1  
972).
- 19) Auerbach, C.: Z. Vererbungslehre, 90, 335 (1

959).

20) Zamenhof, S., Eichhorn, H.H., Rosenbaum- Oliver, D.: Nature, 220, 818 (1968).

21) 坂根, 板野, 飯島: 凍結及心乾燥研究会会誌, 25, 59 (1979).

22) Banno, I., Sakane, T., Iijima, T.: Cryobiology, 15, 692 (1978).

23) 森地, 山里, 鈴木, 高野, 根井: 微生物の保存法(根井編), 62, 東大出版会 (1977).

24) 檜枝: 酵母における適応と制御(長谷川編), 79, 東大出版会 (1977).

25) Hieda, K.: Cryobiology, 15, 693 (1978).

26) Ashwood-Smith, M.J., Grant, E.: Cryobiology, 13, 206 (1976).

27) Grant, E., Ashwood-Smith, M.J.: Proc. 1st Intersect. Congr. IAMS, 5, 592, Science Council of Japan (1975).

28) 森地, 岡本: 凍結及心乾燥研究会会誌, 22, 83 (1976).

29) Tanaka, Y., Yoh, M., Takeda, Y., Miwatani, T.

- :Appl. Environ. Microbiol., 37, 369 (1979).
- 30) Hieda, K., Ito, T. : Freeze-drying of biological materials (Nei, T.), 71, International Institute of Refrigeration (1974).
- 31) Ohnishi, T., Tanaka, Y., Yoh, M., Takeda, Y., Miwatani, T. : J. Bacteriol., 130, 1393 (1977).
- 32) Takano, M., Sinskey, A. J., Baraldi, D. : Freeze-drying of biological materials (Nei, T.), 61, International Institute of Refrigeration (1974).
- 33) Kato, T., Kondo, S. : J. Bacteriol., 104, 871 (1970).
- 34) Town, C. D., Smith, K.C., Kaplan, H. S. : J. Bacteriol., 105, 127 (1971).
- 35) 広瀬：核酸実験法（市川，岡崎，京極，西村編），4，共立出版（1973）。
- 36) Veatch, W., Okada, S. : Biophys. J., 9, 330 (1969).
- 37) Simatos, D., Faure, M., Bonjour, E., Couach,

- M.: Cryobiology, 12, 202 (1975).
- 38) Israeli, E., Kohn, A., Gitelman, J.: Cryobiology, 12, 15 (1975).
- 39) 古賀, 前田, 権田: 凍結・乾燥と細胞障害(根井編), 33, 東大出版会(1970).
- 40) Koga, S., Echigo, A., Nnumura, K.: Biophys. J., 6, 665 (1966).
- 41) Bateman, J. B., Stevens, C. L., Mercer, W. B., Carstensen, E. L.: J. Gen. Microbiol., 29, 207 (1962).
- 42) 高野: 学位論文, 5 (1969).
- 43) Hieda, K.: Mutat. Res., 12, 365 (1971).
- 44) Riley, R. L., Kaufman, J. E.: Appl. Microbiol., 23, 1113 (1972).
- 45) Scott, W. J.: Recent research in freezing and drying (Park, A. S., Smith, A. U.), 188, Blackwell Scientific (1960).
- 46) 根井, 僧都, 荒木: 生細胞の凍結乾燥(根井編), 13, 日本学術振興会(1965).
- 47) Falk, M., Hartman, Jr., K. A., Lord, R. C.: J. A.

- m. Chem. Soc., 85, 391 (1963).
- 48) Ryter, A.: Bacteriol. Rev., 32, 39 (1968).
- 49) Kondo, S., Ichikawa, H., Iwo, K., Kato, T.: Genetics, 66, 187 (1970).
- 50) Witkin, E. M.: Annu. Rev. Microbiol., 23, 487 (1969).
- 51) Witkin, E. M.: Bacteriol. Rev., 40, 869 (1976).
- 52) Ichikawa, H., Kondo, S.: Jpn. J. Genet., 44 (Suppl. 2), 57 (1969).
- 53) Witkin, E. M.: Mutat. Res., 1, 22 (1964).
- 54) Iyer, V. N., Szybalski, W.: Science, 145, 55 (1964).
- 55) Willets, N. S., Clark, A. J.: J. Bacteriol., 100, 231 (1969).
- 56) Kapp, D. S., Smith, K. C.: J. Bacteriol., 103, 49 (1970).
- 57) Town, C. D., Smith, K. C., Kaplan, H. S.: Science, 172, 851 (1971).
- 58) Youngs, D. A., Smith, K. C.: J. Bacteriol., 111,

- 4, 121 (1973).
- 59) Town, C. D., Smith, K. C., Kaplan, H. S.: Radiat. Res., 55, 334 (1973).
- 60) Ashwood-Smith, M. J.: (Proc.) XV International Congress of Refrigeration, p. 1 (1979).
- 61) Webb, S. J.: Nature (London), 203, 374 (1964).
- 62) 森地：凍結・乾燥と保護物質（根井編），78，東大出版会（1972）。
- 63) 森地：生細胞の凍結乾燥（根井編），38，日本学術振興会（1965）。
- 64) Takano, M., Terui, G.: Freezing and Drying of Microorganism (Nei, T.), 131, Univ. of Tokyo Press (1969).
- 65) Spencer, H. M.: International Critical Tables, I, 67, McGraw-Hill Book Co. (1926).
- 66) Alur, M. D., Grecz, N.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 62, 308 (1975).
- 67) Asada, S., Takano, M., Shibasaki, I.: Appl. Environ. Microbiol., 37, 266 (1979).

- 68) Scott, W. S., Maxcy, R. B.: Appl. Environ. Microbiol., 38, 436 (1979).
- 69) Radman, M.: Molecular and environmental aspects of mutagenesis (Prokash, L., Sherman, F., Miller, M., Lawrence, C., Tabor, H.W.), 128, Charles C. Thomas Publisher (1974).

## 謝　　辞

本研究を行なうにあたり、終始御指導を賜  
った恩師、大阪大学工学部教授、荒崎勲先生  
、同助教授、高野光男先生に厚く御礼申し  
上げます。また有益な御指導、御助言を頂いた  
同産業科学研究所教授、原田篤也先生、同  
工学部教授、岡田弘輔先生、大嶋泰治先生を  
はじめ、同教授、合葉修一先生、田口久治先  
生、市川邦介先生ならびに教室員の方々に深  
く感謝致します。

また菌株を供与して頂いた大阪大学医学部  
教授、近藤宗平先生、発酵研究所所長、飯島  
貞二先生をはじめ、日々御指導、御激励頂いた  
大阪大学工学部俵谷孝彦先生、土戸哲明  
先生、小野比佐好氏、勝井則明氏、研究に御  
協力頂いた信夫孝昭、塚正泰元、平松隆司、  
野口彰の各氏に謝意を表します。

本論文に関係ある主な報告

1. Deoxyribonucleic Acid Strand Breaks During Drying  
of Escherichia coli on a Hydrophobic Filter  
Membrane

Appl. Environ. Microbiol., 37, 266 (1979)

2. Mutation Induced by Drying of Escherichia coli  
on a Hydrophobic Filter Membrane

Appl. Environ. Microbiol., 40, 274 (1980)

3. Single-Strand Breakage of DNA Induced by Cell  
Drying on a Hydrophobic Filter Membrane in  
Bacillus subtilis

J. Ferment. Technol. (in press)

4. 跡水性フィルター上で細胞乾燥による  
DNA鎖切斷と突然変異の誘発: その防止策

醸酵工学会誌 58, 423 (1980)