

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	https://hdl.handle.net/11094/2850
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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		1
第 1 章	乾燥による <u>Escherichia coli</u> の DNA 鎖切断	13
第 1 節	緒 言	13
第 2 節	実験材料および方法	15
第 3 節	実験結果	26
	1. 細胞内水分と DNA 鎖切断	26
	2. DNA 鎖切断に対する復水条件 の影響	31
	3. 細胞内不凍水分量と DNA 鎖切断	32
第 4 節	考 察	34
第 5 節	要 約	43
第 2 章	乾燥による <u>Escherichia coli</u> の 突然変異誘発	45
第 1 節	緒 言	45
第 2 節	実験材料および方法	46
第 3 節	実験結果	52
	1. 細胞内水分と突然変異誘発	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	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

結 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、様々な生物学的効果と同時に生じてくる。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学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^{1,2)}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变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性が認識されていたにもかかわらず、詳細が不明であった乾燥による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損傷が起こってい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Webb³⁾らである。ただし、彼らの報告以前に

を乾燥処理によって遺伝的変化が生じること
を認め、簡単な報告は幾つか挙げることもでき
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、Atkin⁴⁾らの報告、巨大コロニーの形状変化を観察した Subramanian⁵⁾らの報告がある。同じ頃に、Braun⁶⁾らも 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った。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、Servin⁷⁻¹⁰⁾-Massieu⁷⁾らは 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、これを認め、

これらは遺伝的变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実を挙げている。このServin-Massieuらの考えは前述したWebbらによって受け継がれ、さらに詳細な検討が加えられることになった。

Webb³⁾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。従っ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もに、細胞をRH 75%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RH 40% ~ RH 50%

で最大となる事実を見出した。^{11, 12)} 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。^{3, 13)} 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がDNAの隣接したピリミジン塩基間に生じる二量体による¹⁴⁻¹⁶⁾ことが明らかにされ、その機構^{16, 18)}についても多くの知見が蓄積されつつあった。

これらの理由により、Webb³⁾ら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さから行なわれなかつた。

Webb^{3, 11-13)}らの一連の報告は、細胞の凍結や乾燥による生物的效果に関心をもち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、乾燥処理による遺伝的変化が見出されるようになった。¹⁹⁾ Auerbachらは Neurospora crassa の乾燥した conidia を 30°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対し、 4°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。²⁰⁾ 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°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った。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 $1/10$ に低下するという報告¹⁰⁾もある。

既に述べた凍結乾燥法やエアロゾル乾燥法以外の乾燥方法でも遺伝的変化^{21, 22)}が起こることかわかってきた。坂根²³⁾らは凍結を伴わないL-乾燥法でも細菌に突然変異が誘発されることを認めた。彼らの結果では、L-乾燥した細菌を 10°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対し、 5°C 以下では有意な誘発は認められなかった。従って最も重要な影響因子は保存温度^{24, 25)}である^{24, 25)}と結論した。一方、檜枝^{24, 25)}らは親水性フィルターを担体とする真空乾燥法を用いて、乾燥による酵母のアデニン要求性変化に最も寄与の大き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²⁶⁾においては認められなかった。

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。Webb³⁾らは myo-inositol がエアロソー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²⁷⁻²⁹⁾ ている。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。

このような遺伝的变化におよぼす酸素、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变化を取り扱ったものか圧倒的に多い。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、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可能であった。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₃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 以下になって始めて生じ、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修復能などに関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も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ナストレスによるこの仮説を提案した。

第2章では乾燥によって生じたDNA鎖切断の修復機構，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鎖切断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，切断した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ものと考えられた。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ったのに対し，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らば、乾燥による突然変異の誘発は a_w 0.53 以下で生じる DNA 鎖切断が野生型 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 鎖切断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、これらの方法では DNA 鎖切断と突然変異誘発に対して種々の影響は認められたが、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関係なく全く DNA 鎖切断、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1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で知られている。たとえば、Escherichia coli のエアロゾル乾燥では糖資化性の変異¹¹⁾とプロファージの誘発¹²⁾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²⁶⁾が、S. cerevisiae でアデニン要求性変異³⁰⁾が起こることが知られている。最近では、親水性フィルター上での常圧乾燥によってもS. cerevisiae に突然変異²⁴⁾が誘発されることが樽枝らによって報告されている。

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

みである。すなわち、E. coliの凍結乾燥後^{26, 31)}に、あるいは Salmonella typhimuriumの凍結-融解³²⁾の過程でDNA鎖切断が起こることが報告されている。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って細胞周囲のRHとの平衡到達が妨げられることになる。これを解決するためにエアロゾル乾燥法³⁾の使用がWebbとStrange⁴⁾らによって勧められている。しかし、この方法は特別な装置を必要とするだけでなく、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 以下になるまで乾燥すると DNA 鎖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に、E. coli K-12 AB 1157 (thr leu pro arg thi lac gal ara xyl mtl tsx^r str^r F⁻), E. coli K-12 AB 2480 (AB1157 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

, streptomycin; r, resistant; thy, thymine および try, tryptophan の各要求性突然変異¹⁸⁾ である。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え能の低下と紫外線感受性の増加がみられる。B. subtilis 168 は醗酵工学教室保存菌であり, 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 培地中で好氣的に 20 時間, 37°C で培養した。EM-9 培地の組成は Na_2HPO_4 ; 1.8%, KH_2PO_4 ; 0.24%, NH_4Cl ; 0.2%, 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 FG LP 02500, 直径 25mm) 上に濾過捕集し, 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 $2 \mu\text{m}^2$ であった。従って使用したフィルターの有効面積が $314 \mu\text{m}^2$ 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る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、塩溶液が沸とうし始めるまで減圧にした後、一定時間、室温（約 20°C ）で放置した。RH 0% のもと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-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、使用開始まで氷浴中に放置した。

この方法では疎水性フィルター上に付着した *E. coli* K-12系の菌体は90%以上回収することが可能であった。また、菌体の濾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ない限り、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、純粋の窒素ガスを乾燥菌体の入った真空デシケータ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3ml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、その細胞懸濁液を透析チューブ(Visking)

に入れ, 3 μ l の脱イオン水に浸し, 2 $^{\circ}$ 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, 3 ml 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 0.1 ml をアルカリ性 γ 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 3 ml の 0.03 M 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 (和

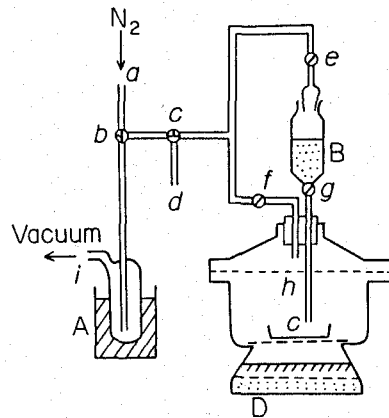


FIG. 1. Apparatus for rehydration in the absence of air. (A) Cold trap with liquid nitrogen; (B) 0.03 M Tris-hydrochloride buffer solution (pH 8.0); (C) a filter membrane mounted with bacteria; (D) saturated salt solution or P_2O_5 for producing required air; (b, c) three-way cock; (e, f, g) two-way 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.

リプトン; 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。

アルカリ性シロ糖密度勾配遠心法による E. coli

の DNA 分画 供試菌を $6 \mu\text{Ci/ml}$ の [methyl- ^3H] thymidine (24 Ci/mmol ; the Radiochemical Centre, Amersham, England) と $500 \mu\text{g/ml}$ 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, 懸濁した後, 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。

アルカリ性シロ糖密度勾配遠心法は N-lauroyl sarcosine (半井化学) の添加を除くことは, Kato および Kondo³³⁾ 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 5PE) 中に調製した 4.3 ml のアルカリ性シロ糖密度勾配上に, 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
ウィングローター(日立 RPS 50-2)を装着した日立
超遠心分離機 55P 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 滴ずつ円形濾紙(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。再び円形濾紙を乾燥後、0.6% の
2,5-diphenyloxazole を溶解させた toluene 10
ml を含むバイアルに移し、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。アルカリ性シロ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、グラティエーター(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(4.3 ml)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 $10 \mu\text{Ci/ml}$ の (methyl- ^3H) thymidine (24 Ci/mmol ; the Radiochemical Centre, Amersham, England), $50 \mu\text{g/ml}$ の tryptophan, $5 \mu\text{g/ml}$ 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°C で培養した。

Spizisen 改変培地は脱イオン水 1 l 当たり、 K_2HPO_4 ; 14g, KH_2PO_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, CaCl_2 ; $40 \mu\text{g}$ および $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $4 \mu\text{g/ml}$ 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 25 mm)上に濾過捕集した。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 0.5 M sucrose, 0.15% EDTA, 0.25 mM NaCl および $80 \mu\text{g/ml}$ の lysozyme (Sigma)

を含む 3 ml の 0.03 M 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ラストに変え, 遠心分離用試料とした。

アルカリ性シヨ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ヨ糖密度勾配上に, 2% sodium dodecylbenzene sulfonate (SDS) を含む 0.1 ml の 0.5 N NaOH を加え, さらにその上に遠心分離用試料 0.2 ml 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 での場合と同じである。

DNA の沈降パターンの解析 アルカリ性シヨ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, フラクシオン番号は遠沈管のメニスカスからの相対距離に, 各フラクシオ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, $n = 6 \left[\left(\frac{D_1}{D_2} \right)^{2.63} - 1 \right]$ 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 $D_1/D_2 = \left(\frac{M_1}{M_2} \right)^{0.38}$ 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³⁵⁾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³⁶⁾から single-strand genome 当たり 6×10^7 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, 压榨パン酵母(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, 濾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

り約 30 mg 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
 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で -100°C まで冷却して 10 分後、
再び $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の昇温速度で加温し、サーモグ
ラムを得た。不凍水分量は Simatos³⁷⁾ 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

乾燥過程中的の *E. coli* の死滅 疎水性フィルター

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った (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

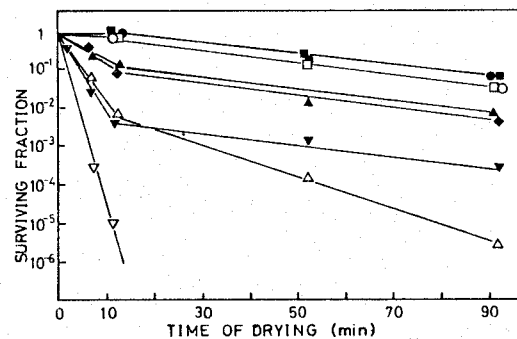


FIG. 2. Survival of *E. coli* K-12 AB1157 (*uvrA*⁺ *recA*⁺) and AB2480 (*uvrA recA*) after drying at various RHs. About 10^8 cells were mounted on a hydrophobic membrane filter, dried at a given RH, and rehydrated with 0.03 M Tris-hydrochloride buffer (pH 8.0). Cell suspensions were then diluted with 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*⁺ *recA*⁺) and AB2480 (*uvrA recA*), respectively. Symbols: □, RH 85%; ○, RH 75%; △, RH 53%; ◇, RH 33%; ▽, RH 0%.

められなかった。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³⁾不明であるが、同じような死滅経過は Webb³⁾ 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 鎖切断 次 Fig.

2 の結果から示唆された DNA 損傷をアルカリ性蔗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。

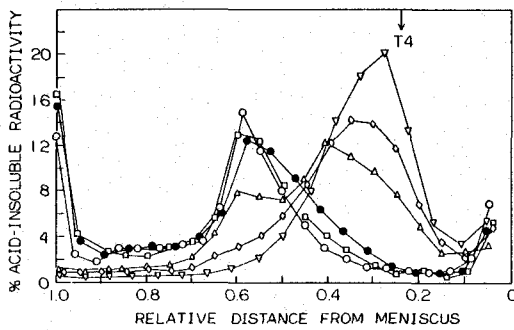


FIG. 3. Sedimentation in alkaline sucrose gradient of DNA from dried *E. coli* K-12 AB1157 (*uvrA*⁺ *recA*⁺). ³H-labeled cells were dried to a given a_w at the corresponding RH for 12 min, then rehydrated with 0.03 M Tris-hydrochloride buffer (pH 8.0), as described in the legend to Fig. 2. Cells were 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.

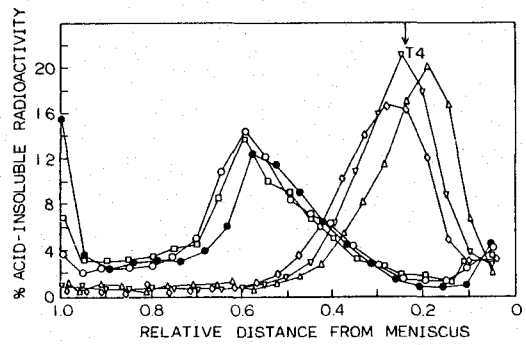


FIG. 4. Sedimentation in alkaline sucrose gradient of DNA from dried *E. coli* K-12 AB1157 (*uvrA*⁺ *recA*⁺). ³H-labeled cells were dried to a given a_w at the corresponding RH for 92 min. Rehydration, lysis, and sedimentation were performed as described in the legend to Fig. 3. The direction of sedimentation 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 本鎖切断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断程度の増大がみられるかほぼ同様の傾向を示している。この結果は DNA の 1 本鎖切断が主に乾燥

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株の高い感受性と同様、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の結果からTownら³⁵⁾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

損傷ならぬに突然変異の誘発はグラム陰性細菌^{3,9,22,26,29)}だけでなく、乾燥に対して抵抗性を示すが

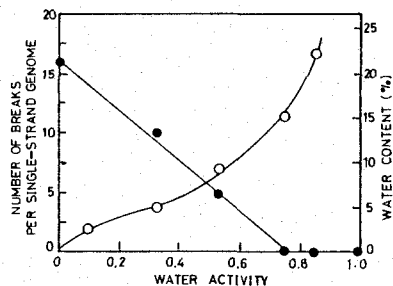


FIG. 5. Relationship between the number of breaks per single-strand genome caused by drying and a_w level of cells. From the results shown in Fig. 3, the number of breaks was calculated by the method of Town et al. (35). Water content of cells at each a_w was measured as the difference in weight between 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.

7) 20) 30)
 ラム陽性細菌, 細菌胞子, 酵母でも乾燥方法
 に関係なく生じることが知られている。DNA
 鎖切断および突然変異の誘発が菌株の乾燥感
 受性とは関係なく起こるのを確かめるために
 , 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 鎖切断
 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った。この結果
 は, 同じ乾燥条件で行なった E. coli での結果
 (Fig. 4) とよく一致し, 乾燥による DNA 鎖切断
 が普遍的な損傷である
 ことを支持している。

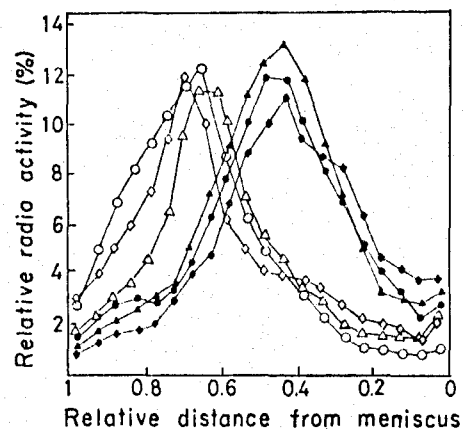


Fig. 6. Sedimentation profile of DNA from dried *B. subtilis* 168 (*thy*⁻, *try*⁻).

³H-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

1) としては Strangers³⁸⁾ や

Israelis³⁸⁾ によって指

摘されている酸素が

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 Tris-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^a

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

^a Dried at RH 0% for 12 min.

^b See text for experimental details.

^c Values indicate average molecular weight \pm standard deviation from mean value.

^d 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鎖切断の有無を調べたが、浸透圧ショックの影響は認められなかった。さらに高張液の代わりに、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も検討したが、DNA鎖切断が観察された。この場合、切断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ったが、0°Cでも37°Cでも同程度のDNA鎖切断が観察された。従って、Fig.3 および Fig.4 で示したDNA鎖切断は復水時で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鎖切断

a_w は細胞内における水の存在状態と密接な

39-42)
 関係があるとして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 鎖切断は a_w に依存するこ
 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ど
 のように関係しているのかを調べる目的で、
 差直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
 によっても異なるし
 , 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 でみる
 と、いずれも 0.75 か

ら 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

^a See text for definition of critical a_w .

の場合、乾燥により細胞内から凍結水がすべて除去され、不凍水も奪われ始める時の 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效果、すなわち細胞致死あるいはDNA損傷が起こり始める時の 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³⁾の³⁾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

乾燥による生物的效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事ができる。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。この新たに考察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事ができる。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、乾燥のみの生物的效果を観察できるようになった点である。

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ロ糖密度勾配遠心法での結果 (Fig.3, Fig.4) から、 a_w 0.53以下になるまで乾燥を行なった時に DNA

鎖切断が起こり始めるといふ結論が得られた。

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、特異的な生物学的効果としてあるいは空中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 以下になるまで乾燥した時にのみ認められるという点では一致しているが、その原因については研究者によって異なった仮説が出されている。Riley⁴³⁾ は細胞集団中の紫外線感受性分布の変化を、Hieda⁴⁴⁾ は非光回復性の胞子型光生成物 (5-thyminy|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の考えとは別に、以下の仮説によって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イマー) が損傷の主体であり、光回復あるいは暗回復によって

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、 a_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、暗回復も起こらないか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效果は乾燥による突然変異の誘発である。^{11, 24)} a_w 0.75 以上と a_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予想されるが、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によ

うに急速な乾燥に特異的な現象ではないのか
 という可能性も考えられる。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(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ってもDNA
 鎖切断は起こること^{26, 31)}、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²⁴⁾にみられることなどから、この可能性を考
 えるのは困難と思われる。

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
 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。

²⁶⁾
 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℃で振盪培養する

と乾燥直後よりも著しく DNA 鎖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 CaCl_2 糖密度勾配遠心法では復水後、スフェロフラ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 鎖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²⁶⁾とは異なり、切断した DNA 鎖の再結合がみられること (第 2 章) から彼らの考え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) 培地中に行なっている。そのため切断した DNA 鎖は再結合せずに、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 鎖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 鎖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が細胞の乾燥過程で起こったためではないかという可能性がまず考えられる。生物試料の乾燥過程で生じる化学反応として知られているのはアミノ-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⁴⁵⁾から DNA 鎖切断との関連は非常に少ないと思われる。また、乾燥過程での酵素反応の可能性も DNA 鎖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。Koga⁴⁰⁾らは乾燥酵母の物性(誘電率および広中NMRのシグナル強度)が含水率10%付近(湿量基準)で著しく変化することを見出している。根井⁴⁶⁾らも熱測定から、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 以下になるまで乾燥されると凍結水だけで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いる。³⁾従って、乾燥によりDNAなどの高分子の構造が変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

Δw 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っている塩基の重なり合い(base stacking)が失われて無秩序型(A型)の構造に変化し始めることが in vitro の実験で示されている。⁴⁷⁾

しかし、in vitroでの結果を in vivoに適用できうるとしても、構造変化の結果として生じるDNA損傷は in vivoの方が in vitro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⁴⁸⁾に、構造変化の際にDNAが受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では分光学的にみる限り可逆的な構造変化である⁴⁷⁾のに対し、in vivoでは不可逆的なDNA鎖切断というDNA損傷の相累の原因となってい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っている。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沖過捕集後、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った。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を示さなかった。

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 以下になっ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鎖切断の関係が認め

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った。また，乾燥終了後の空気導入および復水時における酸素の有無にも影響されなかった。

一方，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 鎖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^{10, 11, 24, 26, 29, 30)}の研究から明らかになっている。しかし、その原因や機構^{26, 29, 31)}については凍結乾燥法で行なわれた簡単な報告^{26, 29, 31)}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 鎖切断は、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^{18, 49-51)}から起こると考えられているからである。

本章では DNA 鎖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 アンバー変異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鎖切断が野生型 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、マーカ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。ところが第1章で用いた E. coli AB1157, AB2480 ではマーカ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 Kondo⁴⁹⁾ によって分離され、それぞれ H/r 30R, 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 locus⁵²⁾ 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発酵研究所

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, その測定は Witkin⁵³⁾ および Kondo⁴⁹⁾ 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い限り, 第1章第2節で述べた方法で行なった。

まず、あらかじめアルギニン要求性の単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 5×10^9 /ml) 2 ml を疎水性フィルター (Millipore FG LP 02500, 直径 25 mm) 上に濾過捕集し、乾燥処理を行なった。ただし、RH 33% での乾燥は $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の代わりに $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を使用した。他の RH での乾燥は第 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 1×10^{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 3×10^9 /ml) とした。

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

nutrient broth (8g/l) を 20 倍希釈したもの), 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 ずつ, 生存率の測定には原液を希釈後, 0.1 ml ずつ 5% SEM 寒天培地上に塗布した。寒天平板は 2 日間 37°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 Kondo⁴⁹⁾ 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プレート 1 枚当たりのアルギニン非要求性コロニー数である。A は乾燥前試料のプレート

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ギニン要求性変化がサプ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℃で20時間、EM-9培地中で好氣的に培養後、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)上に濾過捕集後、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 ^3H -thymidine で標識するため，EM-9 培地に $6\mu\text{Ci/ml}$ の (methyl- ^3H) thymidine (24 Ci/mmol ; the Radiochemical Centre, Amersham, England) と $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ の 2'-deoxyadenosine (Sigma) を添加したものを用了。乾燥終了後，直ちに $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ の非放射性 thymidine を含む 2 ml の EM-9 培地で復水し， 37°C で振盪培養を行なった。一定時間ごとに 0.1 ml の試料をとり，円形濾紙 (Whatman, No. 3, 直径 22 mm) 上にのせて吸収させた。得られた濾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。再び

乾燥後、各濾紙の放射活性を第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で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₃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0.1 mlに対し、0.01 ml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 a_w 0.53 以下になるまで乾燥すると、DNA鎖切断が起こり始めることを見出した。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ってい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、この変異がサプ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%がサプ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 (*arg* → *arg*⁺) by drying of *E. coli* F3294 to various a_w

a_w ^a	Expt no. ^b	Initial bacteria per plate ^c (A) ($\times 10^6$)	Survival fraction in dried bacteria (B) (%)	Revertant colonies per plate			Frequency of induced mutation ^f ($(D - C)/(A \times B)$) ($\times 10^{-8}$)
				Control ^d (C)	Dried ^e (D)	Difference ^e (D - C)	
0	1	8.4	19	12	83	$75 \pm 9.3^{**}$	28 ± 16
	2	9.0	30	11	94		
	3	12	24	38	118		
	4	21	42	13	76		
0.33	1	23	36	11	104	$88 \pm 16^{**}$	13 ± 3.7
	2	17	31	31	128		
	3	21	35	8.5	108		
	4	19	30	14	79		
0.53	1	23	40	11	36	$34 \pm 15^{**}$	6.5 ± 7.8
	2	18	78	22	57		
	3	19	46	14	34		
	4	10	30	38	92		
0.75	1	23	43	11	22	6.7 ± 4.6	
	2	16	89	12	23		
	3	19	48	15	16		
	4	10	58	38	43		
0.85	1	11	65	6.0	17	4.0 ± 5.0	
	2	17	89	9.0	12		
	3	19	57	14	13		
	4	10	74	38	40		

^a Bacteria were dried at corresponding RHs for 12 min.

^b Four numbered experiments were conducted independently of each other.

^c The initial number of nondried bacteria per plate. The number of survivors of dried bacteria is equal to $A \times B$ per plate. The value represents an average of duplicate scores of colonies on 5% SEM agar.

^d The average of duplicate or triplicate scores of the number of revertant colonies on 5% SEM agar.

^e 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.

^f The average and the standard deviation, indicating mutation frequency at the first division of a dried bacterium.

10^{10} 個まで増殖することが既に知られている。⁴⁹⁾
 従って、1枚のプレート上での分裂回数⁴⁹⁾の総和を 10^{10} 回と仮定すれば、自然突然変異の頻度は分裂回数当たり $18 \pm 11 \times 10^{-10}$ となる。一方、 a_w 0.75まで乾燥した場合、アルギニニ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、 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 での 28×10^{-8} である。この結果を分裂回数当たりの誘発頻度で見ると，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び前章で述べた DNA 鎖切断はともに a_w 0.75 以上では起こらず， a_w 0.53 以下でのみ認められた。従って DNA 鎖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ている^{49, 51)}。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，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) ではいずれも

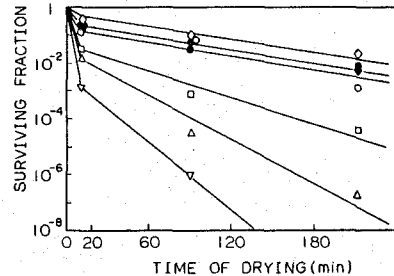


Fig. 7. Survival of DNA repair-deficient mutants of *E. coli* K-12 in the course of drying. About 10^9 bacteria were mounted on a hydrophobic filter membrane, dried at an RH of 0% in vacuo, and rehydrated with 0.03 M tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloride buffer solution (pH 8.0). After appropriate 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*).

親株に比べて乾燥感受性は高くなり, uvrArecA 突然変異株 (AB2480) で最高の乾燥感受性が認められた。 uvrArecA 突然変異株 (AB2480) が recA 突然変異株 (AB2463) 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¹⁸⁾。この結果から, 乾燥感受性は recB, recA の rec 突然変異に強く依

存し、uvrA 突然変異也 polA 突然変異には関係してゐない。従つて、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ゐ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、ないものとしてに分けることができる。前者の損傷としては ^{15,16)} 二量体や相補的な DNA 鎖間の架橋 ⁵⁴⁾ などが知られてゐるが、後者の損傷としては ¹⁸⁾ DNA 鎖切断が報告されてゐるだけである。uvrA 突然変異株では DNA の損傷部位が除去修復されないのので、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が、低い乾燥感受性を示す場合には除去不要性の損傷が DNA に生じてゐ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鎖切断が主であると考
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
ことからも支持される。³¹⁾

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から示唆されたので，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
に起こる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

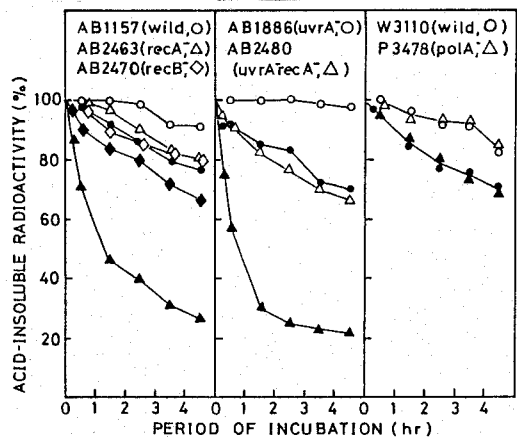


FIG. 8. Degradation of DNA during the incubation of various mutants of *E. coli* K-12 after drying. [^3H]thymidine-labeled bacteria (ca. 10^9) were mounted on a hydrophobic filter membrane, dried at an RH of 0% in vacuo for 12 min, rehydrated with EM-9 medium containing 100 μg of nonradioactive thymidine 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 uvrArecA 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かあるいは若干、高い程度であった。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、同様の結果は紫外線⁵⁵⁾あるいは X 線⁵⁶⁾照射の場合にも報告されている。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、uvrArecA 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 鎖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蔗糖密度勾配遠心法により検討した。

4. DNA 鎖切断の再結合修復

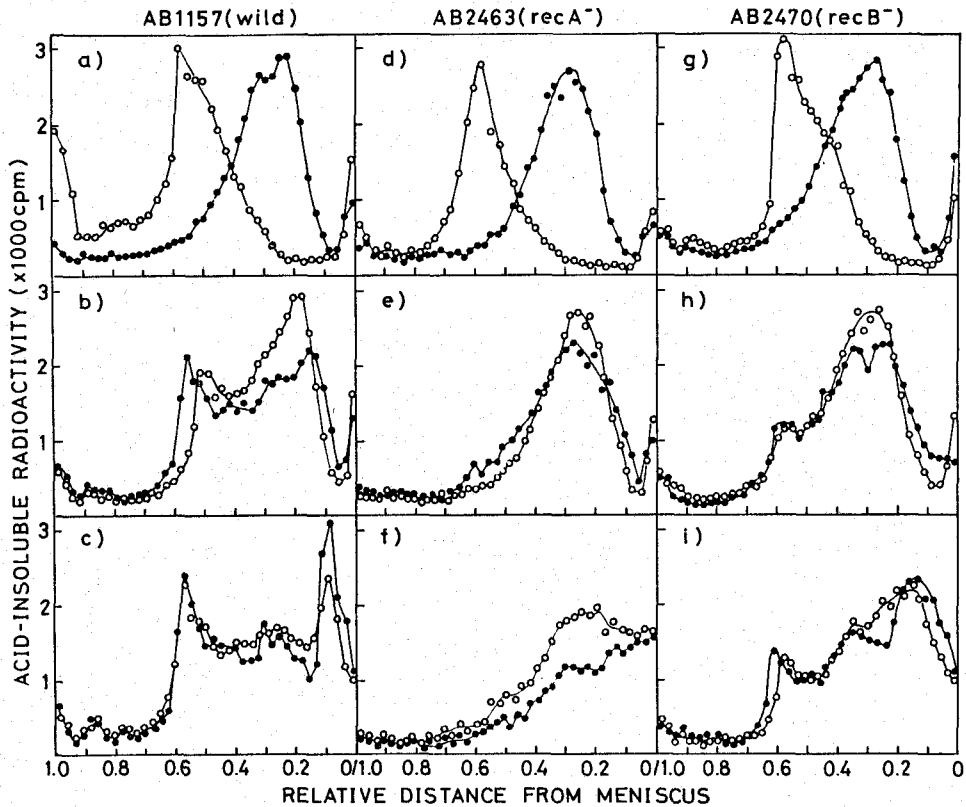


FIG. 9. Sedimentation patterns of DNA from dried and reincubated *E. coli* K-12 AB1157 (wild type [a to c], AB2463 (*recA*⁻) [d to f]), and AB2470 (*recB*⁻) [g to i]. ³H-labeled bacteria (ca. 10⁹) were mounted on a hydrophobic filter membrane, dried at an RH of 0% in vacuo for 12 min, rehydrated with EM-9 medium containing 100 μg of nonradioactive thymidine per ml, and then reincubated aerobically at 37°C. At intervals, samples were withdrawn and 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 から 0.40 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

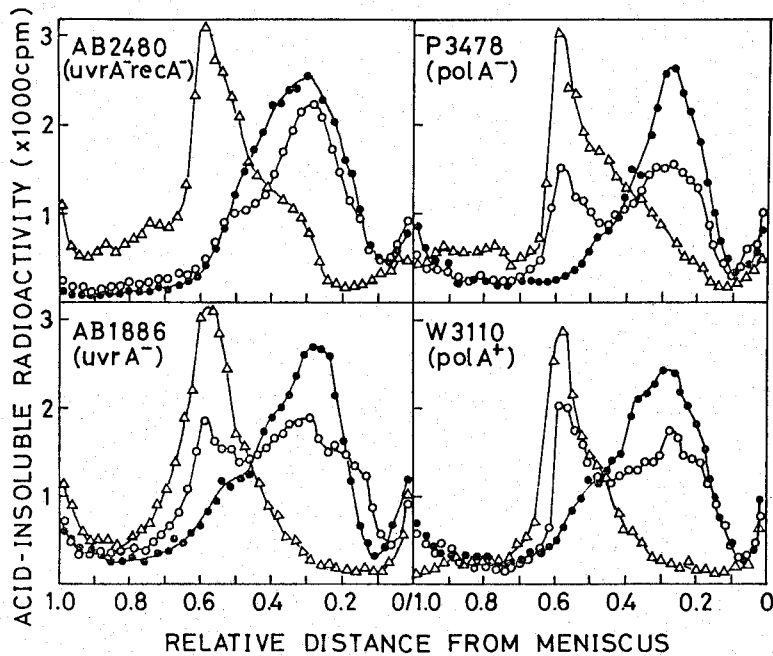


FIG. 10. Sedimentation patterns of DNA from dried and reincubated *E. coli* K-12 AB2480(*uvrA recA*⁻), P3478(*polA*⁻), AB1886(*uvrA*⁻), and W3110 (wild type). The experimental procedures were the same as those described in the legend to Fig. 9. The direction of sedimentation is from right to left. Symbols: Δ , 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る。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った残りの 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 鎖は再培養を行っても全く再結合されなかった (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った (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も再結合されることが報告されている (57)。
そこで, $1/15$ M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中での

再結合の可能性について同様の検討を行なった。しかし、polA 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

切断の程度によるのではなく、その後の修復の程度によって決まることは明らかである。また、再結合に要する培地、時間および関係する遺伝子からみて、乾燥による DNA 鎖切断の修復には Towns^{58,59)} 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

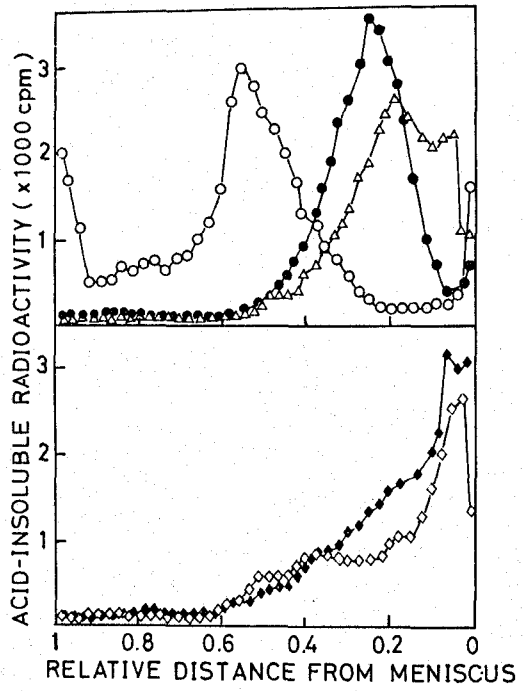


FIG. 11. Sedimentation patterns of DNA from dried and reincubated *E. coli* K-12 AB1157 with a phosphate buffer solution. Procedures were essentially as described in the legend to Fig. 9. ³H-labeled bacteria were dried at an RH of 0% in vacuo for 12 min, reincubated aerobically in 0.05 M phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 100 μg 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^{18,51)}こす可能性のある修復機構の一つである。

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。組換え能が完全に欠失し、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^a

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

^a Bacteria were dried under an RH of 33% for 12 min.

^{b-f} See footnotes to Table 3.

変異誘発は有意に認められ、その頻度も親株 (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ている。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ならば、乾燥による突然変異の誘発機構は次のように説明される。すなわち、 a_w 0.53 以下になる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こっ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関係しないことは、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、誘発が起こる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 以下になるまで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

1) 液状乾燥法)で誘発がみられるのは乾燥菌体を 10°C 以上で保存した時だけであり、乾燥直後あるいは 5°C 以下の低温で保存した時には認められなかった。^{21, 22)}酸素の必要性については²⁶⁾E. coliで否定されているが、^{24, 25)}酵母の真空乾燥の場合には観察されている。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る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も知られている。⁶⁰⁾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るとしている。同様の結果は⁶¹⁾エアロゾル乾燥法の場合にも報告されている。

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いし、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

乾燥の不均一せ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、嫌氣的照射時を除くと 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。^{51, 59)} 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が起るとされている。^{18, 49, 51, 59)} そ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 鎖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った (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 鎖切断が生じ、Type III で修復されるために突然変異の誘発をもちたしたのではないかと考えられる。

これに対し、^{21, 22)} L-乾燥法や ⁶⁰⁾ Ashwood-Smith 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、乾燥直後では短いパッチの DNA 鎖切断しか起こらず、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ったのではないかと推定される。ところが、一定の温度や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し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。ただし、酵母の真空乾燥の場合に主張^{24, 25)}されている酸素の必要性は、酵母に特異的な理由によるのかもしれない。何故なら、E.coli では否定²⁶⁾されているからである。

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こらな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汙過捕集し、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った。しかし、 a_w 0.53 以下になるまで乾燥すると

有意な誘発が認められ、既に見出している乾燥による DNA 鎖切断の a_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 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したのに対し、uvrA と polA の各突然変異株はそれぞれ親株と同程度の感受性であった。乾燥による DNA 鎖切断とその再結合についてアルカリ性 Δ 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 uvrA recA 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ったが増殖培地中でみられた再結合は全く認められなかった。

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った。従っ
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 鎖切断が野生型 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物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わないように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るが、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性から乾燥処理を主に用いている²³⁾。従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係なく認められる突然変異の誘発は大きな問題^{3, 10, 21, 26, 29, 30)}なっている。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-inositol²¹⁾ の添加³⁾、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られた報告はなく、脱脂乳²⁹⁾ や monosodium glutamate の添加²⁶⁾、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ジの誘発も、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^{24,25)} あるいは高い RH (75%以上) の水蒸気の導入であった。

この両者に比べて防止効果は劣るが、有効であったのは KNO₂ や glucose の添加²⁴⁾ 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 以下になるまで乾燥した時に起こる DNA 鎖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 鎖切断が起こらないようにするか、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 NaCl 密度勾配遠心法により検出した DNA 鎖切断を指標として、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 鎖切断 第1章で用いた方法により、(methyl- ^3H) thymidine で標識した約 $10^8/\text{ml}$ 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% (w/v) あるいは 6% (w/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) 上で濾過捕集したものを乾燥用試料とした。この試料を $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ の飽和塩液を含むデシケーター (RH 33%) 内に置き, 塩液が室温 (約 $20^\circ C$) 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デ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-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 3 ml で復水し, その懸濁細胞の DNA 鎖切断について, 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 鎖切断 上記の

[methyl- 3H] 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 $-20^\circ C$ または $-80^\circ C$ 中で 2 時間凍結保持した。その後, $37^\circ C$ 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，アルカリ性蔗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，洗淨，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°C ， -80°C あるいは -180°C に2時間凍結保持した。その後， 37°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 ずつ，生存率測定にはさらに約 2×10^3 /ml になるように希釈後，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。本章で用いた乾燥法は本質的に真空乾燥法であることから、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RH 33%(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

鎖の切断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 鎖切断
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いこと知られてい

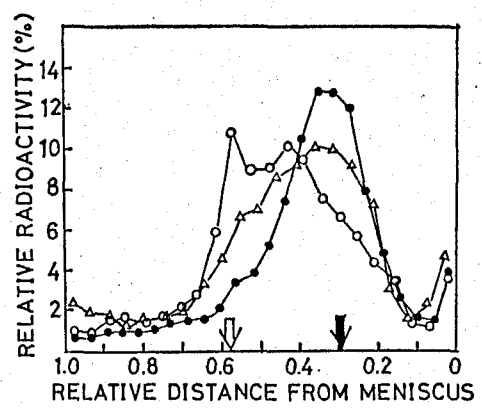


Fig. 12. Sedimentation profile of DNA from dried *E. coli* K-12 AB1157 (wild-type for repairability). ³H-Thymidine-labeled cells (about 10⁸) were suspended in the medium containing various protective substances, mounted on a hydrophobic membrane filter, dried at RH 33% for 12 min, and rehydrated with 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 (Arg⁻ to Arg⁺) by drying of *E. coli* F 3294.

Suspending medium	Exp. no. ^a	Initial cells per plate ^b (A)	Surviving fraction of dried bacteria (B)	Revertant colonies per plate ^c			Frequency of induced mutation ^e (D-C)/(A×B)
				Control (C)	Dried (D)	Difference ^d ((D-C))	
		×10 ⁸	%				×10 ⁻⁸
Deionized water ^f	1	23	29	24	116		
	2	27	21	36	122		
	3	18	29	23	71	76±20**	12±2.7
	4	25	34	34	113		
1% mono-sodium glutamate ^f	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		
1% myo-inositol ^f	1	27	33	36	82		
	2	18	26	23	57		
	3	28	24	16	110	60±27**	11±5.1
	4	25	15	34	102		
1% D-glucose ^f	1	23	21	24	127		
	2	33	24	30	212		
	3	18	33	23	140	129±36**	21±1.2
	4	25	22	34	147		
6% myo-inositol ^f	1	5.1	71	12	16		
	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		
6% myo-inositol ^g	1	23	25	24	59		
	2	33	46	30	85		
	3	23	30	39	69	39±11**	4.6±0.9
	4	25	33	34	69		

^a Each experiment was conducted independently.

^b 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.

^c Average of duplicate or triplicate counts of revertant colonies on 5% SEM agar.

^d 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.

^e Average and the standard deviation of (D-C)/(A×B), indicating mutation frequency at the first division of a dried bacterium.

^f Bacteria were dried under RH 33% for 12 min.

^g Bacteria were dried under RH 33% for 92 min.

63)

るか、Fig.12の結果はこれに矛盾しない。

一方、突然変異の誘発も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ものに比べて、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^{26,27)}凍結乾燥の場合にAshwood-Smithら²⁸⁾が指摘している。また、乾燥によるプロファージの誘発において、保護物質が頻度を高めること²⁸⁾が森地らによって報告されている。その原因は不明であるか、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こと³⁾がWebbらによって報告されている。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った。Fig.13にDNA鎖

切断について, 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
る。従って Webb³⁾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
燥がきわめて不十分となるために, 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沙過

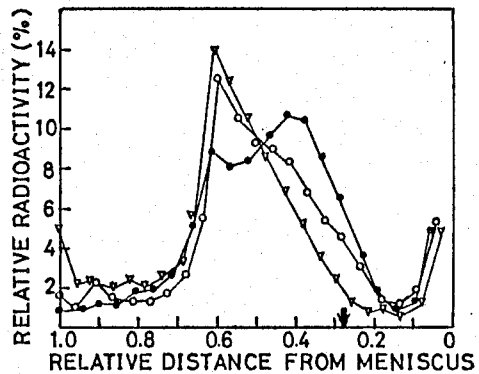


Fig.13. Sedimentation profile of DNA from dried *E. coli* K-12 AB1157 (wild-type for repairability).

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: ∇ , 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きわめて少なく, 菌体の乾燥速度はこ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ことにより, 脱水に伴って起こる DNA 鎖切断も変異誘発頻度を下げることも可能ではないかと考えたからである。こ

の場合, 乾燥は 0°C で行ない, 乾燥の Q_{10} ⁶⁴⁾ が約 2 であることを考慮して乾燥時間を室温での 4 倍の 48 分間とし, さらにその 2 倍の 96 分でも実験を行なった。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

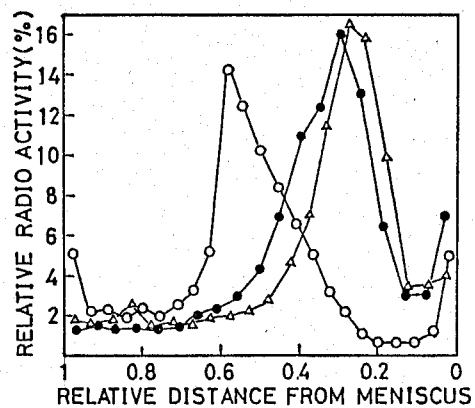


Fig. 14. Sedimentation profile of DNA from dried *E. coli* K-12 AB1157 (wild-type for repairability).

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°C for 48 min (without addition of protective substance); △, dried at 0°C for 96 min (without addition of protective substance).

Table 6. Induction of mutation (Arg⁻ to Arg⁺) by drying of *E. coli* F3294 at 0°C.

Time of drying (min)	Exp. no. ^a	Initial cells per plate ^b (A)	Surviving fraction of dried bacteria (B)	Revertant colonies per plate ^c			Frequency of induced mutation ^d (D-C)/(A×B)
				Control (C)	Dried ^e (D)	Difference ^d (D-C)	
		×10 ⁸	%				×10 ⁻⁸
48	1	33	23	30	45		
	2	23	30	28	64	30±14**	6.2±3.9
	3	23	15	39	78		
96	1	33	26	24	62		
	2	23	19	28	43	31±14**	5.6±2.4
	3	23	19	17	58		

^a, ^b, ^c and ^d cf. Table 5.

^d 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.

^e 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うし、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う(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

一章で述べたように

凍結水のみを除去、

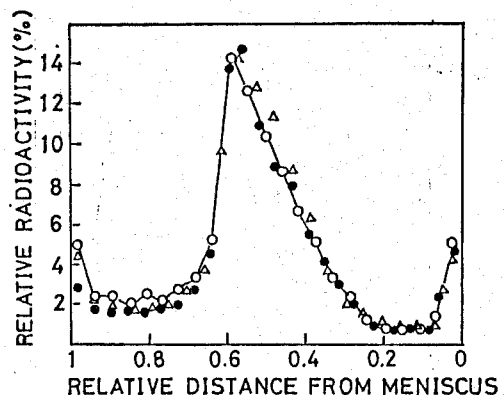


Fig.15. Sedimentation profile of DNA from frozen and thawed *E. coli* K-12 AB1157 (wild-type for repairability).

³H-Thymidine-labeled cells were suspended in deionized water (10⁸/ml), frozen and kept at -20°C or -80°C for 2 hr, then thawed immediately at 37°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°C, then thawed; △, frozen and kept at -80°C, then thawed.

Table 7. Effect of freezing and thawing on the induction of mutation (Arg⁻ to Arg⁺) of *E. coli* F3294.

Temp. of freezing (°C)	Exp. no. ^a	Initial cells per plate ^b (A)	Surviving fraction of frozen and thawed bacteria (B)	Revertant colonies per plate ^c		
				Control (C)	Frozen and thawed ^d (D)	Difference ^e (D-C)
		×10 ⁷	%			
-20	1	10	16	27	23	
	2	12	60	18	17	-1.3±2.5
	3	11	58	20	21	
-80	1	10	91	27	30	
	2	12	67	18	20	3±1
	3	11	42	20	24	
-180	1	10	91	27	26	
	2	12	100	18	20	2.3±3.5
	3	11	67	20	26	

^a and ^c cf. Table 5.

^b 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.

^d Frozen and kept at various temperatures for 2 hr, and then thawed immediately at 37°C.

^e Average and the standard deviation of difference, D-C, for each pair.

すなわち a_w 0.75 までの脱水によつては DNA 鎖切断が起こらないこと (Fig. 3 および Fig. 4) を挙げることもできる。ただし, 対数期の *S. typhirium* 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か Takano³²⁾ および Alur⁶⁶⁾ によつて報告されている。従つて菌株保存には定常期の菌株を用意し, 低温凍結処理で行なうのが最も好ましいと結論した。

第4節 考察

菌株保存のための乾燥方法としては凍結乾燥^{26, 29)}法, L-乾燥法(凍結を伴わない液状乾燥法),³⁰⁾真空乾燥法があるが, いずれの場合にも乾燥によって突然変異が誘発される。ただし, Webb³⁾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告⁶⁰⁾もある。

一般にはDNA損傷が起こるとそれに伴って^{18, 49)}突然変異の誘発頻度が増大することが多い。従って, 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ない。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, 十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1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鎖切断が防げるとするならば、保護物質が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っ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りDNA鎖切断が生じる³¹⁾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Webb³⁾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、すなわち乾燥そ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十分な水が残り、長期にあた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は防止できな^{27, 29)}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^{24, 25)}、復水速度⁶⁷⁾、復水培地⁶⁷⁾、酸素の有無^{26, 67)}などに関係なく 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ない。

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が期待できる。

i) 乾燥に対する抵抗性の強い Micrococcus radiodurans ⁶⁸⁾ 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 ^{26, 27)} 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。

ii) 乾燥に対して抵抗性の弱いグラム陰性細菌 ⁶²⁾ 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 の使用を廃し，myo-inositol などの保護物質を使用するようにする。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。L-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

るとほとんどの誘発されな^{21, 22)}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^{24, 25)}せると著しく突然変異の誘発頻度が高まること¹⁾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。

v) 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的濃縮が起らないようにする。

今後、乾燥による突然変異の誘発を防止するためには、野生型 polA 遺伝子^{18, 49)}に支配される修復機構^{51, 69)}が働くようにするが、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 鎖切断および

突然変異の誘発を防止するため、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つた。さらに乾燥温度を下げた場合でも同様に防止できなかつた。これに対し、低温凍結処理では凍結温度に関係なく DNA 鎖切断および突然変異の誘発は認められなかつた。

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 1 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対し、 a_w 0.53 以下になっ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おける酸素の有無に関係しなかった。さらに E. coli を $a_w 0.75$ 以下になるまで乾燥すると，凍結水だけでなく不凍水までも細胞から除かれ始めること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 鎖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 鎖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，修復機構を中心に検討した。

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 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すのに対し，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しか示さなかった。この結果から，乾燥による DNA 損傷は主に DNA 鎖切断であること，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蔗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った。

一方、アルカ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 以下になって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。さらに野生型 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 鎖切断は野生型 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 鎖切断と突然変異の誘発を防止するために、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 鎖切断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 鎖切断の面から明らかにした。

低温での乾燥の効果については 0℃ 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った。従って、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ったが、新しい乾燥法を考案することにより in vivo での検討が可能になった。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ってい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 以下になるまで乾燥すると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 Microbiol. 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. Acad. Sci. U.S., 51, 226 (1964).
 - 16) Boyce, R.P., Howard-Flanders, P.: Proc. Natl. 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 (1972).
 - 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・乾燥の細胞障害 (根井編), 33, 東大出版会 (1970).
- 40) Koga, S., Echigo, A., Nunomura, 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) Rytter, 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., 11

- 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, 日本學術振興会 (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、芝崎勲先生、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、市川邦介先生なす心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、塚正泰之、平松隆司、野口彰の各氏に謝意を表します。

本論文に關係ある主な報告

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. 疎水性フィルター上での細胞乾燥による DNA 鎖切断と突然変異の誘発: その防止策

醗酵工学会誌 58, 423 (1980)