

Lactobacillus casei S-1 菌株의 Bacteriophage 分類

金玲基 · 白永振 · 裴炯錫 · 柳 敏

韓國 야쿠르트 研究所 微生物 研究室
(1985년 8월 7일 수리)

Classification of Bacteriophage of *Lactobacillus casei* strain S-1

Young-Kee Kim, Young-Jin Baek, Hyeong-Suk Bae and Min Yoo

Lab. of Microbiology, Korea Yakult Institute
(Received August 7, 1985)

The classification of bacteriophage could be followed by several criteria. In this study three criteria were used for classification of *Lactobacillus casei* bacteriophage. In serological classification, antiserum was prepared by rabbit and used for classification. The inactivation effect of phage by antiserum was exponential and *L. casei* phage was classified into three serological groups by inactivation rate (K-values). The Lac Y group was proved as a new serological group but the Lac J and Lac S group were shown the same results as previous reports. From the comparison of restriction enzyme pattern of phage DNA, Lac J group was divided into four sub-groups. According to the difference of host range, Lac J-II group was further subdivided into three groups. These results were shown that *L. casei* strains S-1 bacteriophage was classified into 8 sub-groups. The phage YK of Lac Y group was shown to consist of a icosahedral head about 95nm in diameter, a contractile tail about 150nm in length and 20nm in width. The tail of YK phage is composed of stacked disks (4nm repeat) and a hexagonal baseplate. The molecular weight of YK phage DNA was approximately 85.6 Mdalton.

치즈나 醱酵乳를 생산하는 乳加工業에서는 phage 汚染 防止에 관한 중요성이 강조되어 왔다¹. 치즈 생산과 관련된 *Streptococcus* phage에 관하여는 많은 연구가 행하여졌으나^{2,3}, *Lactobacillus* phage에 관하여는 보고된 바가 적다⁴. 그 중 *Lactobacillus casei* phage는 J-1 phage가 異常醱酵의 원인으로 보고된⁵ 이래, Sakurai등⁶이 血清學的으로 J-1과 SGT group으로 나누고, J-1 group은 다시 宿主域에 따라 I, II, III, IV group으로 細分하였다. 姜등⁷, 金등⁸도 역시 발효유 공장에서 phage를 분리하여 숙주역에 따라 분류한 바 있다.

일반적으로 phage의 분류에 관하여는 많은 기준이 이용되고 있으나 Ackermann등⁹은 形態學的特性, DNA의 物理化學的特性, 宿主域, 血清學的特性등을 포함하여 DNA의 hybridization 및 제한효소

절편의 차이 등에 의한 phage의 類緣關係가 중요한 분류의 基準이 된다고 하였으며, 溶菌斑의 크기, 吸着속도, 潛伏期, 放出數, pH 安定性 및 plating 効率등은 培地나 균주의 영양상태 및 外的인 환경의 변화에 의해 큰 영향을 받으므로 분류의 기준으로는 적당하지 않다고 하였다. 이러한 사실은 Sakurai등⁶, Murata등¹⁰의 보고에서도 잘 나타나 있다.

본 연구에서는 phage 사고의 예방을 위한 기초 연구로서 *L. casei*를 種菌으로 사용하고 있는 두 곳의 공장에서 약 40여株의 phage를 분리한 후 숙주역, 항원형, 제한효소에 의한 DNA 분석등에 의해 분류를 행한 바 既存의 분류보다는 細分化할 수 있었고, 형질학적으로 새로운 종류의 phage가 분리되었으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

菌株 및 培地

宿主菌으로 사용된 균주는 *Lactobacillus casei* S-1株(ATCC 27139) 및 S-1株의 變異株로서, S-1주를 포함한 YIT 9018, 9021, SGR, J₁R 등은 일본 야쿠르트 연구소에서, PR-3, PR-4, PR-38, PR-1001, SM-2, CM-39등은 성균관 대학교 낙농학과에서 분양받아 사용하였으며, CM², EBC-1, CW-1 등은 한국 야쿠르트 연구소에서 보관 중인 균주를 사용하였다. 또한 phage 균주중 J-1, SGT, TL은 일본 야쿠르트 연구소에서 분양받았으며, 그 외의 phage 균주는 한국 야쿠르트 공장의 배양 탱크 및 하수에서 S-1주를 숙주균으로 하여 純粹 分離한 후 사용하였다.

Phage의 増殖 및 titer測定에는 Murata등⁽¹⁰⁾의 MRT 배지를 사용하였다.

宿主域의 調査

分離된 phage株는 2회 이상의 plaque분리로 純粹 分離한 후 S-1株 및 變異株들에 대한 吸着 및 溶菌 여부로서 숙주역을 조사하였다. 숙주역의 측정에는 Adams등⁽¹¹⁾의 重層法을 이용하였으나 다만 上層(軟寒天 培地)에 조사할 숙주균만을 分散시켜 균한 후 여기에 순수 분리된 phage의 용균액을 멸균된 이쑤시게로 spotting하였다. 이것을 37°C에서 18시간 배양한 후 溶菌現象을 관측하여 숙주역을 결정하였다.

抗血清의 製造

抗原으로 쓰일 phage 용균액은 Yamamoto등⁽¹²⁾의 방법에 따라 PEG 6,000으로 처리하여 濃縮시켰다. 농축된 phage 액은 chloroform을 처리한 후 0.01 M 인산 완충액(pH 6.0)을 용출액으로 Sepharose 4B gel filtration을 하여 精製하였으며 이때 phage는 void volume에서 용출되었다. 이렇게 얻어진 phage 액의 titer는 ml당 10¹¹ plaque forming unit 이상이었다. 정제된 phage액은 phage-adjunct(Freund's complete)의 同量 혼합액으로 만든 다음 2ml를 토끼(male, 3kg)에 multiple intradermal injection을 행하였다. 그 후 2週 간격으로 항체를 검사함과 동시에 phage액만을 귀경맥에 2~3회 booster injection함으로써 항체의 titer가 ml당 10⁶ 이상 올라가면 혈청을 수거하여 56°C에서 10분간 열처리한 후 냉동보존하면서 사용하였다.

抗血清에 의한 中和試驗

제조된 항혈청의 titer分析 및 phage의 type分類

는 Adams등⁽¹¹⁾의 phage 항혈청의 분석법에 따라 행하였다. J-1 항혈청 1,000배 희석액 및 SGT 항혈청 500배 희석액 각각 2.7ml에 희석된 phage 용균액(10⁷p. f. u./ml) 0.3ml를 가하고 37°C water bath에서 10분간 中和시킨 다음 중화되지 않은 phage수를 측정하였다. 恒溫에서 中和常数 K는 $2.3 \times D/t \times \log P_0/P$ 로 나타나며, 여기서 D는 항혈청의 희석배수, t는 반응시간(분), P₀는 반응 전의 phage수, P는 반응 후의 phage수이다. 따라서 위에서 얻어진 값을 식에 대입하여 K값을 구한 후 각 phage에 대한 항혈청의 K값을 비교하여 혈청학적 關聯을 조사하였다.

Phage DNA 분리 및 제한효소 절편분석

분리 정제된 phage액(10¹¹ p. f. u./ml)에서의 phage DNA분리는 Maniatis등⁽¹³⁾의 phage λ DNA 분리방법을 사용하였으며 抽出된 DNA는 UV-Vis spectrophotometer(Varian 634UV)에 의해 254nm에서의 吸光度를 측정함으로써 정량되었다. Phage DNA의 제한효소 절편을 얻기 위하여 분리된 DNA 1μg을 각 제한효소의 반응 용액에 녹인 후 定量的 제한효소를 가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 65°C에서 10분간 열처리한 후 ice bath에서 急冷시키고 염색액을 가하여 1%의 Agarose gel에 loading시켰다. 전기영동 완충액으로는 0.089M Tris-borate buffer(pH 8.0, 0.05 M EDTA)를 사용하여 20V에서 18시간, 또는 50V에서 5시간 전기영동하였다. 이때 표준 DNA는 phage λ DNA의 제한효소 절편이 사용되었다. 전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide수용액(0.5 μg/ml)에서 30분간 염색한 후 UV illuminator(UV Products Inc., TM-36)에서 DNA 절편을 관측하였다.

電子顯微鏡에 의한 phage의 觀察

Collodion 支持膜을 입힌 200mesh copper grid에 carbon coating을 한 후 phage 농축액을 15초 동안 처리하고 여분의 수분을 濾紙로 충분히 흡수시킨 다음 1% uranyl acetate용액(pH 5.2)를 한 방울 가하여 30초 동안 negative staining한 후에 건조시켰다. 처리된 phage 시료는 JEM CX-II 전자현미경(80KV) 하에서 관찰되었다.

결과 및 고찰

宿主域에 의한 分類

*Lactobacillus casei*를 숙주로 하는 phage는 다

Table 1. Classification of *L. casei* S-1 bacteriophages by host range patterns.

Host Phage	I	II	III	IV	V	VI
Lac J-I	+	+	+	-	-	+
Lac J-II a	+	-	+	-	-	+
J-II b	+	+	-	-	-	+
J-II c	+	-	-	-	-	+
Lac J-III	+	+	+	-	+	-
Lac J-IV	+	+	+	-	+	+
Lac S	+	+	-	+	+	+
Lac Y	+	+	-	-	+	+

*+; form the plaque.

큰 균주의 phage와 구별하기 위하여 Ackermann등¹⁹이 提案한 방법으로 숙주균의 屬 이름 첫 두자와 種 이름 첫자를 따서 Lac이라 하였다. 순수 분리된 40여주의 phage들은 *L. casei* S-1株 및 변이주들에 대한 溶菌力 여부로서 분류를 행하였다.

Spot test에 의한 용균력 시험 결과 Table 1과 같이 S-1 주를 포함한 모든 변이주를 용균시킬 수 있는 phage는 발견되지 않았고 Lac J group의 phage는 Sakurai등¹⁶이 분류한 4 group보다 細分되어 6 종류의 subgroup으로 분류할 수 있었다. 그러나 이 결과는 다양한 변이주를 사용하였기 때문에 既存의 분류와는 相互 關聯의 비교가 어려웠고 결국 서로 脈絡을 같이 할 수 없었다. 숙주역에 따라 분

Table 2. *L. casei* S-1 bacteriophages classified by host range patterns.

(Groups)	Phage Strains
1) Lac J-I	J-1, ϕ -1, P82, P2A, P7D, P81
1) Lac J-II a	TK-6, Y5D, P6D
J-II b	TK-93, P83
J-II c	P11, P5D
1) Lac J-III	TK-84, ST-84, ϕ BN, JMS-3, WS-1, WS-2, WS-3
1) Lac J-IV	K-1, P4D
1) Lac S	SGT, TL, Y16D, Y16S, Y18D, P50D, Y11, P41, P4D, P61, P21, P42, Y13T
1) Lac Y	YK, P22, Y15D, Y15C, Y13D, Y18S

Table 3. *L. casei* S-1 mutants classified by susceptibility for *L. casei* S-1 bacteriophages.

Groups	Strains
I	<i>L. casei</i> S-1, 9018, 0001, CM", EBC-1, J,R, PR-3
II	<i>L. casei</i> 9021
III	<i>L. casei</i> SGR
IV	<i>L. casei</i> PR38, PR1001
V	<i>L. casei</i> SM2, PR4, CM39
VI	<i>L. casei</i> CW-1

류된 각 group의 phage들은 Table 2에 정리하였으며 特記할 만한 사실은 Lac Y group의 phage를 새로이 분류할 수 있었고 또한 生理化學的 特性이 類似하여 분류가 어려웠던 S-1株 및 변이주들을 phage에 대한 感受性 여부로서 Table 3과 같이 6 종류로 분류하였다는 것이다. 여기서 대부분의 변이주들은 S-1株와 같이 I group에 속하였으나 그 외의 변이주들은 변이가 誘發될 때 세포막 또는 세포벽에 phage의 吸着 및 增殖을 阻害하는 어떠한 物理化學的 性質의 변화, 예를 들면 phage吸着部位의 化學的 成分 변화나 3次元의 구조 변화등이 일어나 phage에 대한 感受性이 변화되었을 것으로 생각되어 진다.

血清學的 分類

Phage의 血清학적 兪관은 phage 항원성에 의한 中和試驗으로 결정되어 질 수 있으며 본 연구에서는 Adams¹¹¹가 提案한 中和率(K-value)의 비교에 의해 血清학적 分類를 행하였다. Phage는 항원성에 의해 對數的으로 不活性化되며 이때의 中和速度 常數는 $P/P_0 = e^{-K \cdot t/P}$ 의 식에서 K로 나타나게 된다. 결국 phage가 항원성에 대하여 親和力이 클수록 K값은 커지게 된다. 숙주역에 의해서 분류된 각 group의 phage에 대한 항원성의 K값은 Table 4와 같다. 이 결과에서 J-1 항원성은 Lac J group의 subgroup에 따라 50~360의 다양한 K값을 보여 주는 반면 Lac S group의 phage에 대하여는 10 정도의 값을 보였고, SGT 항원성은 Lac S group의 phage에 대하여 115의 K값을 보인 반면 Lac J group의 phage에 대하여는 약 5 정도 밖에 되지 않아 두 group의 phage는 血清학적으로 다른 종류임을 알 수 있었다. 그러나 Lac Y group의 phage는

Table 4. K-values of the antisera for *L. casei* S-1 bacteriophages.

Phage Antiserum	Lac J	Lac S	Lac Y
Anti J-1	50-360	10	16
Anti SGT	5	115	11

J-1 항혈청에 16, SGT 항혈청에 11의 K 값을 보여 두가지 항혈청 모두에 친화력이 적은 것으로 나타났다. 이것은 Lac Y group의 phage가 Lac J group이나 Lac S group과는 혈청학적으로 연관이 적은 것을 나타내며 이러한 사실은 100배 희석된 두가지 항혈청에 대하여 각 phage group의 시간에 따른 중화정도인 Fig. 1에서 더욱 확실하게 확인할 수 있었다. 여기서 SGT, J-1 항혈청에 의하여 Lac YK phage가 약간의 중화현상을 보이는 것은 항혈청의 농도가 높고 또한 제조된 항혈청이 polyclonal antibody로서 흡착부위에 대한 항체뿐만 아니라 다른 부위의 항체가 혼합되어 이들에 의한 영향을 받기 때문인 것으로 생각되어 진다.

適正 농도로 희석된(1,000배) J-1 항혈청에 대

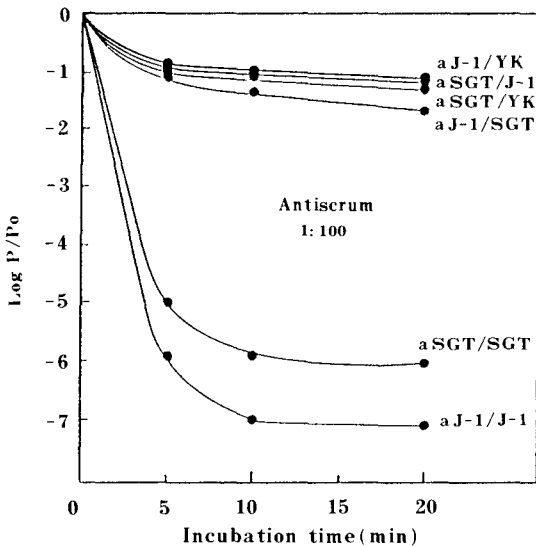


Fig. 1. Neutralization of *L. casei* S-1 bacteriophages by antisera.

*aSGT : SGT antiserum
 aJ-1 : J-1 antiserum
 P₀ : initial plaque forming unit per ml
 P : survival plaque forming unit per ml

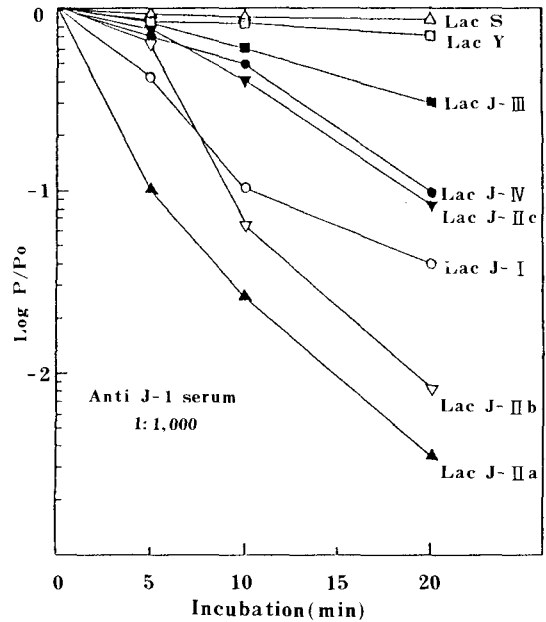


Fig. 2. Neutralization of *L. casei* S-1 bacteriophages by diluted anti J-1 serum.

하여 각 phage group들의 중화경향은 Fig. 2와 같이 Lac S, Y group의 phage들은 거의 중화되지 않는 반면 Lac J group의 phage들은 다양한 중화 경향을 보였다. 이중 Lac J-III group 및 Lac J-IV group은 1,000배 희석된 J-1 항혈청에 의해 저해정도가 작아 Lac S나 Lac Y group과의 구별이 어려우나 J-1 항혈청의 10배 희석액 및 100배 희석액에서는 현저한 차이의 중화현상을 보였고, 이것으로 이들 두 group은 Lac J group의 subgroup으로 분류가 가능하였다. 그러나 높은 농도의 항체에서는 subgroup간의 중화정도의 차이가 작아서 상호연관 정도를 알 수가 없었기에 Fig. 2에서는 Lac J group 내 subgroup 간의 상호연관을 관측하기 위하여 1,000배 희석된 항혈청에 의한 저해정도를 나타내었다. Phage 항혈청에 대한 親和力은 抗原으로 사용된 phage가 가장 큰 것으로 보고되어 왔으나⁽¹⁴⁾ 이 결과에서는 J-1 항혈청에 대하여 Lac J-IIa와 Lac J-IIb group의 phage가 Lac J-I group보다 더 큰 친화력을 보였다. 이것은 이들 세 group의 吸着機構가 유사한 3차 構造로 되어 있을 가능성을 示唆하는 것이며 이러한 가능성은 이들의 DNA 제한효소 절편 樣相이 매우 유사하게 나타난 본 연구의 결과 및 host range mutant들이 혈청학적으로 매우 밀접하다는 Jarvis등⁽¹⁵⁾의 보고로서도 支持될 수 있으나, phage 흡착기구와 이들의 혈청학적 特異

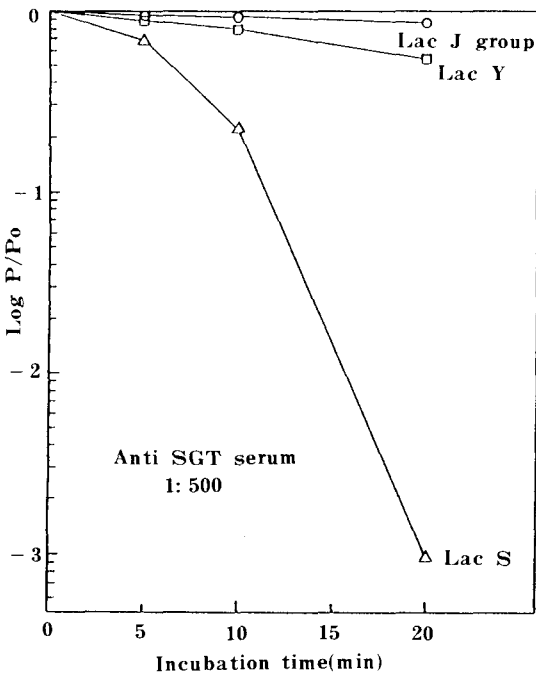


Fig. 3. Neutralization of *L. casei* S-1 bacteriophages by diluted anti SGT serum.

성을 연관지어 더욱 연구하여야 할 과제라고 생각된다.

한편 500배 희석된 SGT 할혈청에 의한 각 group의 중화경향을 Fig. 3에 나타냈으며 여기서 Lac S group의 phage들은 심한 중화현상을 보였으나 Lac J, Y group의 phage들은 거의 중화현상을 보이지

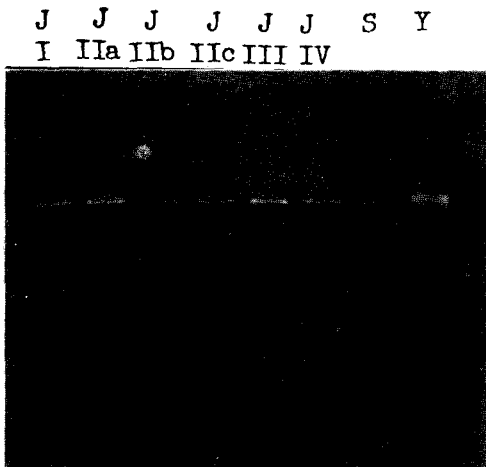


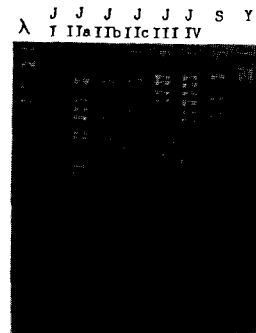
Fig. 4. *L. casei* strain S-1 bacteriophage DNA. Electrophoresis was in 0.089M Tris-borate buffer (pH 8.0) on 0.6% Agarose gel for 5 hr at 3.5 V/cm.

않았다.

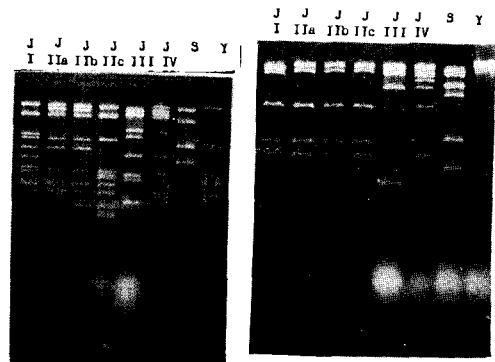
제한효소에 의한 phage DNA의 절편 비교

L. casei phage의 유전자는 J-1⁽¹⁶⁾, PL-1⁽¹⁷⁾ 및 prophage^(18,19)에 대하여 연구 결과가 보고된 바 있으며 이러한 결과는 대부분 제한효소에 의한 DNA 절편 비교 및 hybridization에 의해 이루어졌다. 제한효소는 DNA 내의 특이한 監基排列 즉 認識部位를 특異적으로 절단하는 효소로서 phage간의 類縁性を 밝히는 데 널리 이용되고 있다⁽²⁰⁻²²⁾.

본 연구에서는 숙주역으로 분류된 각 group간의 유연성을 밝히기 위하여 각 group의 대표적인 phage를 선택하여 (Table 3에서 각 group의 첫번째 phage株) DNA를 분리하고 제한효소에 의한 절편의 양상을 비교하였다. 결과는 편의상 각각의 phage 이름 대신 각 group의 이름으로 나타내었다. Fig. 4는 phage DNA의 전기영동 사진으로서 DNA가



(A)



(B)

(C)

Fig. 5. Restriction fragments from *L. casei* S-1 bacteriophage DNA.

Electrophoresis was in 0.089M Tris-borate buffer (pH 8.0) on 1% Agarose gel.

- (A) EcoR I fragments (20hr, 1V/cm).
- (B) Hind III fragments (5 hr, 3.5V/cm).
- (C) Pst I fragments (5 hr, 3.5V/cm).

순수분리 됐음을 확인할 수 있었으며 phage λ DNA의 절편을 표준 DNA로 하여 분자량 측정 결과 Lac J-I에서 Lac S까지는 약 25×10^6 에서 30×10^6 정도의 분자량을 보였고 Lac Y group의 YK phage만이 86×10^6 의 큰 분자량을 보였다. 순수분리가 확인된 DNA는 EcoRI, Hind III, Pst I에 의해 분석되었다. EcoRI에 의한 절편 양상에서는 Fig. 5 A와 같이 Lac J, S, Y group의 형태가 서로 많은 차이를 나타내서 혈청학적 분류 결과와 잘 일치하였으나, Lac J group내의 Lac J-II a와 J-II b는 숙주역에 차이가 있음에도 불구하고 동일한 절편 형태를 보이고 있다. 이것은 제한효소의 認識部位에는 변화가 없이 흡착기구에 관련된 유전자部位에 point mutation이나 base shift mutation이 일어났을 가능성을 示唆하고 있으며 이러한 가능성은 흡착부위의 단백질 구조나 흡착부위의 관련된 DNA의 sequencing에 의해 확인될 수 있을 것이다. 마찬가지로 Fig. 5 B와 같이 Hind III에 의해 얻어진 DNA 절편 양상에서도 앞의 두 group은 동일한 결과를 보여주고 있다. 그러나 Pst I에 의해 얻어진 결과에서는 Fig. 5 C와 같이 Lac J-II a, II b group 뿐만 아니라 Lac J-II c group까지도 동일하게 나타나 EcoRI에서의 결과와 같은 가능성을 재 확인해 주었다. 제한효소로는 DNA내의 세세한 변이를 확인할 수는 없기 때문에 숙주역에 의한 분류등과 같이 相互 補完에 의한 분류가 바람직하다 하겠다.

이상의 분류 결과를 종합해 보면 Fig. 6 과 같이 항혈청에 의해 3 group으로 분류되었던 *L. casei* S-1 phage는 DNA의 분석에 의하여 Lac J group이 4 subgroup으로 세분되었고 다시 숙주역의 차이에

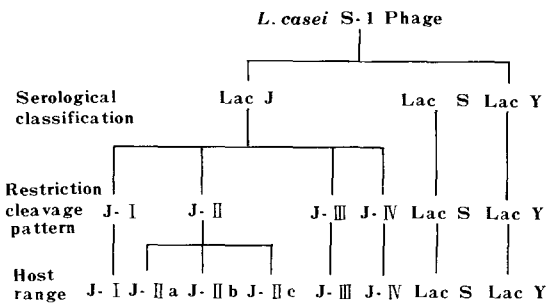


Fig. 6. Summary of the classification of *L. casei* S-1 bacteriophage by serological character, restriction cleavage pattern and host range.

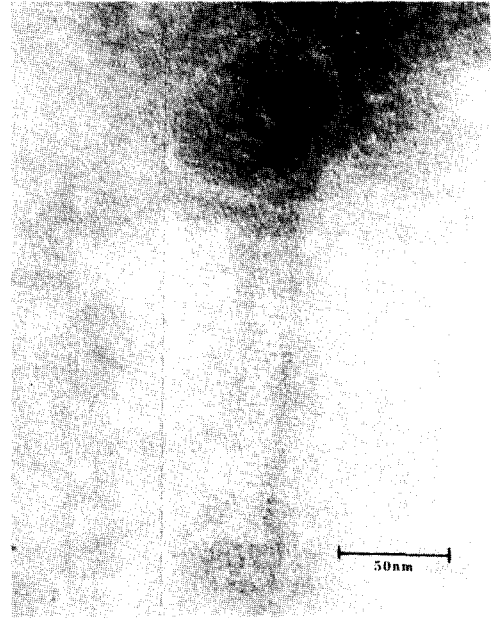


Fig. 7. Electron micrograph of *L. casei* phage YK.

의하여 Lac J-II group이 3 subgroup으로 세분되어 총 8 group으로 분류되었다.

電子顯微鏡에 의한 觀察

항혈청에 의해 3 group으로 분류된 *L. casei* phage중 Lac J-1 (J group) 및 Lac SGT(S group) phage의 형태에 관하여는 이미 보고된 바 있으며, (6, 8, 23) 새로이 분류된 Lac YK(Y group) phage는 Fig. 7 과 같이 직경이 95nm 정도의 icosahedral head와 길이 150nm, 넓이 20nm의 收縮性 tail로 구성되어 있었다. 그중 tail은 약 4nm의 stacked disk로 이루어져 있으며 끝에는 hexagonal baseplate를 갖고 있어 *E. coli* T₄ phage의 tail과 유사하였으나²⁴⁾ tail fiber는 확인할 수 없었다.

사 사

本 研究遂行에 있어서 恒常 指導 鞭撻해 주신 尹 快炳 所長님과 phage의 전자현미경 觀察에 많은 도움을 주신 서울대 수의대 이영순 교수께 感謝드립니다.

요 약

Bacteriophage의 分類는 여러가지 基準에 의해 수행될 수 있으나 본 연구에서는 *L. casei* bacterio-

phage를 분류하기 위하여 3 가지의 분류 기준이 사용되었다. 血清學的 분류에서는 토끼에서 제조된 항혈청이 사용되었으며 항혈청에 의한 phage의 中和 効果는 數的이었다. *L. casei* phage는 항혈청에 의한 中和率에 따라 3 가지로 분류되었다. 여기서 Lac Y group은 새로운 종류임이 밝혀졌으며 Lac J 및 Lac S group은 지금까지의 보고와 동일한 결과를 보여주었다. 제한효소에 의한 phage DNA 절편의 비교에 의하여 Lac J group은 4 종류의 subgroup으로 나누어졌으며, 宿主域의 差異에 의해서 Lac J-II group은 다시 3group으로 細分되었다. 이러한 결과를 종합하면 *L. casei* S-1株의 bacteriophage는 총 8 종류로 나누어 질 수 있었다.

새로 분류된 Lac Y group의 YK phage는 직경이 95nm 정도의 icosahedral head와 길이 150nm, 넓이 20nm 정도의 收縮性 꼬리로 구성되어 있고 끝에 hexagonal baseplate가 있었다. YK phage DNA의 분자량은 약 86 Mdalton이었다.

참고문헌

- Erickson, R.J.: *Dairy Ind. Inter.*, **45**(3), 37 (1980).
- Chopin, M.C., A. Chopin and C. Roux: *Appl. Env. Microbiol.*, **26**(6) 741(1976).
- Sozzi, T., H. Bauer, R. Maret and E. Dentan: *Milshwissenschaft*, **35**(1), 17(1980).
- Murata, A.: *J. Ferment. Ass. Jap.*, **26**, 521(1968).
- Hino, M. and N. Ikebe: *J. Agr. Chem. Soc. Jap.*, **39**, 472 (1965).
- Sakurai, T., S. Kubo and E. Onoue: *日農化*, **49**(3), 169 (1975).
- 강국희, 백영진, 강영찬, 김기원: 한국산업미생물학회지, **5**(1), 13 (1977).
- 김영찬, 박민철, 강국희, 윤영호, 이광웅: 한국산업미생물학회지, **17**(4), 165 (1969).
- Ackermann, H.W., A. Audurier, L. Berthiaume, L.A. Jones, J.A. Mayo and A.K. Vidaver: *Adv. Virus Res.*, **23**, 1(1978).
- Murata, A., E. Soeda and R. Saruno: *日農化*, **43**(5), 311 (1969).
- Adams, M.H.: Bacteriophage, Interscience Publisher Inc., New York, (1959).
- Yamamoto, K.R., B.M. Alberts, R. Benzinger, L. Lawhorne and G. Treiber: *Virology*, **40**, 734 (1970).
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: Molecular cloning A Lab. Manual, p. 85, Cold Spring Harber Lab., New York, (1982).
- Klerk, H.C., J.N. Coetzee and J.J. Theron: *J. Gen. Microbiol.*, **32**, 61(1963).
- Jarvis, A.W.: *Appl. Env. Microbiol.*, **36**(6), 785(1978).
- Ichioka, S. and H. Ishiwa: *virus(Jap.)*, **23**, 148(1973).
- Watanabe, K., S. Takesue and K. Ishibash: *Agr. Biol. Chem.*, **44**, 453(1980).
- Shimizu-Kodota, M., T. Sakurai and N. Tsuchida: *Appl. Env. Microbiol.*, **45**, 669(1983).
- Shimizu-Kodota, M. and N. Tsuchida: *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 423(1984).
- Bailey, N.J., D.R. Dembinski and W.T. McAllister: *J. Virol.*, **35**, 176(1980).
- Capage, M.I., J.K. Goodspeed and J.R. Scott: *Plasmid*, **8**, 307(1982).
- McDonell, M.W., M.N. Simon and F.W. Studier: *J. Mol. Biol.*, **110**, 119(1977).
- 桜井稔三, 高橋徳太郎, 上山訓由, 新井浩: ウイルス, **19**(6), 72 (1969).
- Crowther, R.A., E.V. Lenk, Y. Kikuchi and J. King: *J. Mol. Biol.*, **116**, 489(1977).