

## 海洋性発光細菌 *Vibrio harveyi* に感染する バクテリオファージの性状

日高富男, 小林真澄, 有村澄広

### Characterization of the Bacteriophages Infecting Marine Luminous Bacterium *Vibrio harveyi*

Tomio Hidaka\*, Masumi Kobayashi\*, and Sumihiro Arimura\*

**Keywords:** Luminous bacteria, bacteriophage, *Vibrio harveyi*, Kagoshima Bay

#### Abstract

Bacteriophages infecting marine luminous bacterium *Vibrio harveyi* have been isolated from seawater and fish in Kagoshima Bay, during 1980 to 1985. The eighty-five of isolated bacteriophages were divided into three groups with their lytic pattern to host bacteria. The representative three *V. harveyi*-phages were observed about the host range, plaque morphology, particle structure, stability, one-step growth characteristics, and serological property. They are phages with a long and noncontractile tail, and also stable phages with double-stranded DNA as genetic material. The test phages varied in host range, plaque morphology, one-step growth characteristics, and serological property. These phages may provide a rapid and sensitive means of differentiating *V. harveyi* strains by phage typing method.

海洋性発光細菌の中で *Vibrio fischeri* に感染するバクテリオファージ (単にファージともいう) の性状については前報<sup>1)</sup>で報告したが、引き続き同じ海洋性発光細菌に属する *Vibrio harveyi* に感染するファージを検索・分離し、それらの性状を研究した。海洋性発光細菌は *Photobacterium* と *Vibrio* の2属にわたる6種が知られている<sup>2)</sup>。それらの海洋における生態は多彩であるが、菌種別に見れば個々に特徴がある<sup>3)</sup>。*V. harveyi* は中温性で、基質利用性が多様な沿岸性の菌種である。従って、この菌は温帯海域で夏季に多く検出され、その分布は表層水温の変化と深い関係がある<sup>4)</sup>。鹿児島湾のような温帯海域にあっては夏期に沿岸域に多く見られる<sup>3)</sup>。Yetinson and Shilo<sup>5)</sup> と Shilo and Yetinson<sup>6)</sup> は、地中海と Elat 湾における発光細菌の季節的、地理的分布を検討し、菌種によって異なった分布様相を見出している。その際に地中海において、*V. harveyi* は年間を通して生息しているが、実は夏、冬交互して異なる亜種が現れていた。よって、*V. harveyi* は、さらに詳しく亜種レベルの分布

\* 鹿児島大学水産学部微生物学研究室 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 50-20 Shimoarata 4, Kagoshima, 890 Japan)

を検討すべきだと指摘している。この菌種に感染するファージについては Yetinson and Shilo<sup>5)</sup> の地中海における発光細菌の分布に関する報文の中で、この菌種の亜種を区別するのにファージ感受性を指標とすることを示唆しているが、具体的なファージの性状については言及されていない。著者は海洋発光細菌種のファージ型別を試みているが、それを念頭におきながら、本報では鹿児島湾内海水及びその海域に生息する魚類の体表、消化管内容物から *V. harveyi* を分離し、それらに感染するファージを検索、単離した。それら *V. harveyi*-ファージ系の代表 3 株の性状について報告する。

### 実験材料及び方法

**供試微生物** 本報で供試する *V. harveyi*-ファージ系は、1981年から1985年の5年間に於いて、鹿児島湾内の沖合と沿岸域の海水、および湾内に生息する魚類から検索、分離したものである。海水は常法により J-Z 採水器を用いて無菌的に採取して供試した。また供試魚は釣獲されたクロサギ (*Gerres oyena*)、ゴンズイ (*Plotosus anguillaris*) のいずれも体長 20~25cm のもので、それらの体表、消化管内容物を実験対象とした。

**使用培地** 供試菌の培養、保存やファージの分離、増強、保存に使用した培地は海水培地 (Sea Water Broth, SWB)、海水寒天培地 (Sea Water Agar, SWA)、軟海水寒天培地 (soft Sea Water Agar, sSWA) である。SWB の組成は 75% 濃度の人工海水 (Herbst's) 1 l にポリペプトン (大五) 5 g、酵母エキス (大五) 1 g を溶解し、最終 pH が 7.6~7.8 になるように調整したものである。SWA、sSWA は SWB に粉末寒天をそれぞれ 1.5%、0.5% 濃度に加えて溶解し作成した。

**ファージ定量法** 試料ファージ液中のファージの定量は、Adams<sup>7)</sup> の記載に準じ、二重寒天平板法による溶菌斑形成単位 (plaque forming units, pfu) として滴定した。すなわち、予め SWB で適宜  $10^8$  希釈を行なったファージ液に宿主菌新鮮培養物 ( $10^8$  cells/ml) を等量混ぜ、25℃ に 5~10 分間放置して宿主細胞にファージ粒子を吸着させる。その吸着液 0.2 ml を予め溶解し 45℃ に保温した sSWA 3 ml に注加し手早く混和した後、そのすべてを SWA 平板 (基層平板) 上に流し込み重層する。重層寒天が固化するのをまって 25℃ で 1 晩培養した。この方法で二重寒天平板上に形成された溶菌斑を計数し pfu/ml を算出した。

**ファージの一段増殖実験法** 標示菌を SWB で 1 晩培養したもの 0.5 ml を 4.5 ml の SWB に移植しさらに 2~3 時間培養した。その新鮮培養物 ( $10^8$  cells/ml) 0.5 ml とファージ液 ( $10^6$  pfu/ml) 0.5 ml とを SWB 4 ml 中に加え混和し吸着管として 25℃ で 20 分間培養した。その間にファージ粒子は宿主細胞に吸着される。20 分後その吸着管を SWB で 1/100 に希釈してファージの吸着を停止した後、それを増殖管として引き続いて培養した。増殖管からは所定時間毎に試料の一部を取り出し適宜希釈してファージ数を滴定し、放出ファージ数を算出した。別に、ファージ粒子の宿主細胞への吸着率を算出するため、吸着 20 分後の吸着管における全ファージ数と未吸着ファージ数とを滴定した。すなわち吸着管を 1/100 に希釈した直後、その一部をとり感染中心体数を滴定して全ファージ数とし、また他の一部について、その中の未吸着ファージを分けるためにミリポアー (HA, 0.45  $\mu$ m) を通し、その濾過液について遊離ファージ数を滴定した。こうして得られた吸着 20 分後の全ファージ数と遊離ファージ数と

の差を吸着ファージ数とし、その全ファージ数に対する百分率を吸着率とした。

**ファージ濃縮法** ファージを濃縮する方法にはいろいろあるが本報では分別遠沈濃縮法を用いた。すなわち常法で増強調製されたファージ液を低温高速遠沈 (0℃, 37,000×g, 90分間) し、分別したファージ粒子のペレットを少量の液に再懸濁した。懸濁用液はそのファージの用途に応じて選択した。電顕標本作成に使う場合は1%酢酸アンモニウム水溶液に、免疫原として使う場合には1/6濃度人工海水に懸濁した。この方法でファージ濃度を100倍位に濃縮できた。

**電子顕微鏡観察** ファージ濃縮懸濁液 (1%酢酸アンモニウム水溶液に対し $10^{10-11}$  pfu/ml) を試料とし、リンタングステン酸による陰染色標本を作成した。すなわち、ファージ濃縮液を2%リンタングステン酸水溶液 (KOHでpH7.2に調整) と等量混和し、それをコロジオン膜でおおって炭素蒸着したシートメッシュ上に滴下し、30~60秒後残余の試料液を濾紙で適度に吸い取り乾燥させる。これを電子顕微鏡試料とし、日本電子製電子顕微鏡、JEM 100B型に挿入し、電顕実拡大60,000倍で観察した。

**抗ファージ血清の作成** ファージ濃縮懸濁液 ( $10^{10-11}$  pfu/ml) を免疫原として実験用ウサギに接種した。供試ウサギは生後2ヶ月の雄で体重1.8~2.0kg位のものであった。これらの下腹部皮下に、免疫原の3mlを接種した。注射は3~4日間隔で、11~12回行なった。免疫が相当に進んだと思われる時期に全採血を行なった。全採血は最後の免疫接種日から10日~22日の間に行ない、ウサギ耳翼静脈よりできるだけ多く採血した。

採血した血液は大形遠沈管に採り、斜面にして室温に放置し凝血させ、血清と血餅に分離した。4時間ほどで血餅は収縮するが、この際スパーテルで血餅を切っておくと血清の収量は上がる。冷蔵庫 (5℃) で1晩保持した後、分離した血清をさらに3000 rpm, 20分遠心分離し、上清を抗ファージ血清として試験管に分注した。この血清を56℃, 30分間加熱して非働化した。血清は非働化を行なうだけに止め、防腐剤は加えずに使用した。各供試ファージに対する抗ファージ血清について、本文中では抗aφ血清を [a], 抗bφ血清を [b], 抗cφ血清を [c] と略称する。

**抗血清による中和試験** 抗ファージ血清にファージを加えて抗原抗体反応を行い、反応後の生残ファージ数を測定し、抗ファージ血清のファージ中和率を算出した。

中和試験は30℃で予温した抗ファージ血清 0.9 ml にファージ液 ( $10^7$  pfu/ml) を0.1 ml 加え混合した後、30℃で所定時間反応させた。所定時間後、反応液の0.1 ml を氷冷SWB 9.9 ml に加えてすばやく攪拌し、中和反応を停止させた。この液について生残ファージ数を測定した。対照試験は中和反応系の中の抗ファージ血清に代えてSWBを加え、同様に行った。測定結果から中和率 (%) を算出した。

## 実験結果および考察

### 1. 供試 *V. harveyi*-ファージの由来

*V. harveyi* はその生育温度域が10~37℃, 基質利用性が多様で、また生育には200~300 mMのNa<sup>+</sup>を要求するなどの性格を有し、海洋中では沿岸海域の海水をはじめ魚体表、魚

類消化管内などに分布している。供試 *V. harveyi*-ファージ系は鹿児島湾内の海水および魚類から分離したものであり、調査海域としては偏っていると言えよう。*V. harveyi* の生菌数はおおよそ海水 1 ml 当り 7 cfu, 魚体表 1 cm<sup>2</sup> 当り 4 cfu, 魚類腸内容物 1 g 当り  $5 \times 10^5$  cfu であった。そして海水中のそれは春から夏にかけて、沿岸域に多く見られた。

海水からの分離 *V. harveyi* のうちファージ感受性を示した菌株は35%位であり、それらに感染するファージは海水から1株分離されただけであった。その後調査試料を魚類関連微生物にひろげることによって魚類消化管内容物から多くの *V. harveyi* を分離し、それらの約45%がファージ感受性菌であった。それらすべての *V. harveyi*-ファージ系(85系)を純化、鑑別し、宿主菌とファージを相互に交差感染試験して類似性を検討した結果3つのファージ群に整理されたものである。それらのファージを *V. h-a*  $\phi$ , *V. h-b*  $\phi$ , *V. h-c*  $\phi$  と符号し、本文中では a  $\phi$ , b  $\phi$ , c  $\phi$  と略称する。a  $\phi$  はクロサギ消化管内容物から、b  $\phi$  は海水あるいはクロサギ消化管内容物から、c  $\phi$  はゴンズイ消化管内容物からそれぞれ当初に分離されたものである。海中には b  $\phi$  が多く、時に a  $\phi$  が検出されたが、c  $\phi$  は魚類消化管内容物から検出され、海中からの検出は少なかった。このように供試 *V. harveyi*-ファージ3株は異なる分布域を示した。それらの生態学的な比較は別報にゆずる。

## 2. 宿主域

供試ファージ3株の宿主域を比較するため、それらとファージ感受性 *V. harveyi* との相互間で交差感染試験を行なった。その結果を Table 1 に示す。Table 1 で明らかなように、ファージ感受性 *V. harveyi* の3菌株(A, B, C株)に対して、供試ファージの a  $\phi$  はA, B, Cの3菌株全部に感染し、b  $\phi$  はB, C株に、c  $\phi$  はC株のみに感染するという宿主域に違いが見られる。これを逆にいえば、A, B, C菌株は a  $\phi$ , b  $\phi$ , c  $\phi$  の3ファージに対する感受性パターンから3型に分けられ、*V. harveyi* 菌種をさらに菌株レベルでファージ型別しうることが知られた。

Table 1. Cross infectivity of test phages against *V. harveyi* strains.

<i>V. h</i> -phages	Host	<i>Vibrio harveyi</i> -strains		
		A	B	C
<i>V. h-a</i> $\phi$		+	+	+
-b $\phi$		-	+	+
-c $\phi$		-	-	+

+ : Infective

- : Non-infective

## 3. 溶菌斑形態

供試 *V. harveyi*-ファージはそれぞれの指示菌株に対して二重寒天平板培養上において Fig. 1 に示すような溶菌斑形態を現わした。a  $\phi$  の溶菌斑は直径 1~1.5mm の正円、透明であり、b  $\phi$  のそれは a  $\phi$  のものよりやや小さく直径 0.5~1mm で透明である。c  $\phi$  は直径 1mm 位の不正円の混濁した溶菌斑である。a  $\phi$  と b  $\phi$  の溶菌斑形態はやや類似しているが、c  $\phi$  のそれは前二者とは明らかに異なっている。

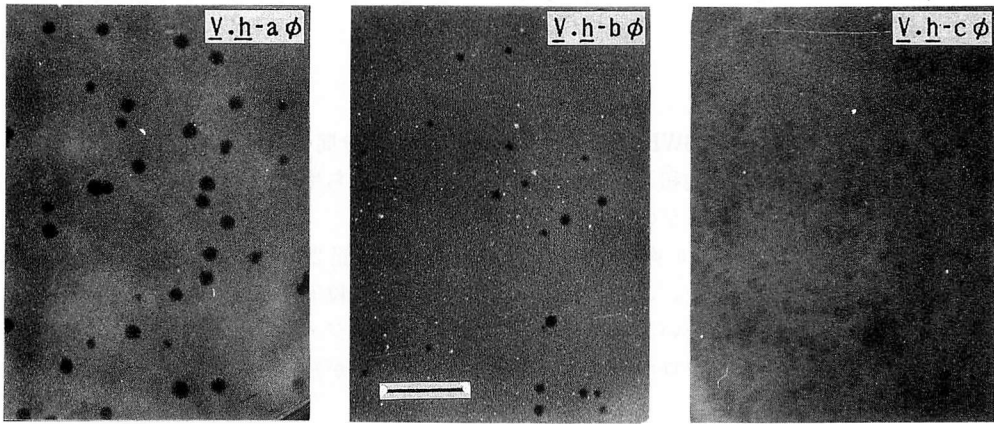


Fig. 1. Plaque morphology of *Vibrio harveyi*-phages. Bar=10mm

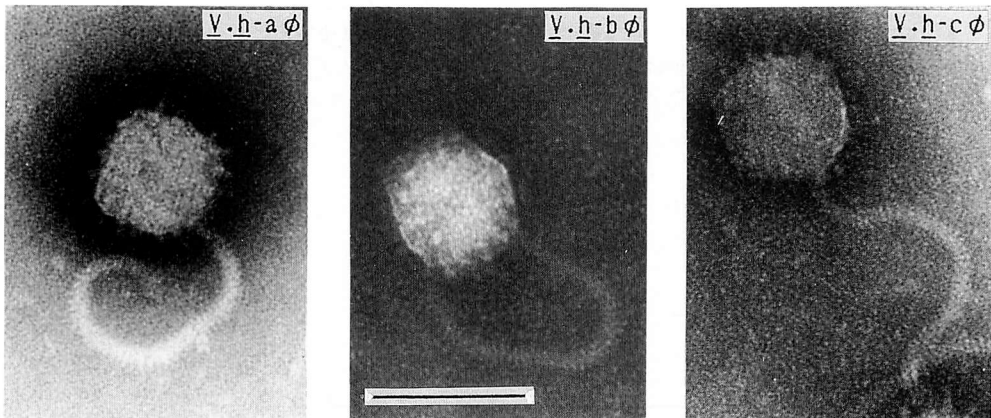


Fig. 2. Electron micrographs of *Vibrio harveyi*-phage particles negatively stained with phosphotungstic acid. Bar=100nm

#### 4. ファージ粒子構造

供試 *V. harveyi*-ファージの粒子構造は Fig. 2 に示すとおりである。Fig. 2 に見られるように、供試ファージ粒子はいずれも頭部と尾部からなる構造を呈している。その頭部は外観六角形の多面体であり、それに非収縮性の湾曲した尾部が付いている。尾部は全面にモザイク状を呈し、その末端はノブ様構造が見られる。

それらの各部の大きさは、頭部の直径が80 nm、尾部の幅が13~15 nm、その長さが200~220 nmである。a φ、b φ、c φの三者はほぼ類似する粒子構造を示している。

各供試ファージの遺伝物質の確認を Bradley<sup>8)</sup>の蛍光染色法で行なって2本鎖DNAであることが知られた。

## 5. 安定性

供試ファージをそれぞれSWBに懸濁した状態で50℃, 30分間の加熱処理, あるいはファージ懸濁液にクロロホルムを飽和し2時間放置するなどしたのち生残ファージ数を測定して, それらの条件下での各ファージの安定性を比較検討した。

供試 *V. harveyi*-ファージ a φ, b φ, c φ はいずれも上記2処理によって失活することなく安定なファージであった。このことより, 供試ファージ粒子は脂質など不安定要因となる特別な物質を含むものでないことがわかった。またファージ・ライゼイト作成時の無菌化には加熱処理, あるいはクロロホルム処理を行ないることが知られた。

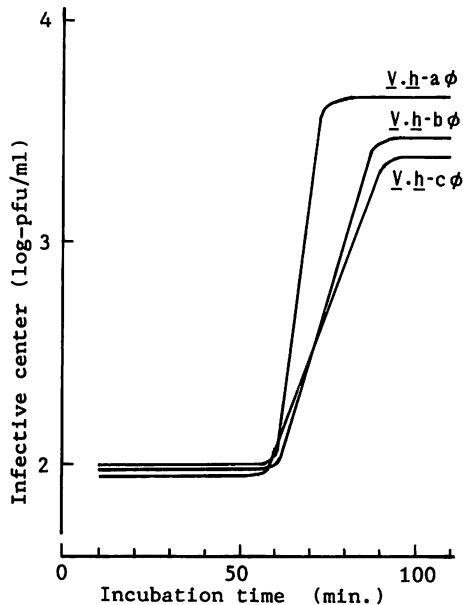


Fig. 3. One-step growth curves of *Vibrio harveyi*-phages.

## 6. 一段増殖特性

供試 *V. harveyi*-ファージ系について一段増殖実験を行なって, それらの一段増殖曲線を Fig. 3 に示す。この図から各ファージが宿主細胞に感染・増強し放出するまでの過程を知りうる。すなわち, 各ファージの潜伏期 (分), 上昇期 (分), 平均放出量が算出できる。それらはそれぞれ a φ では60分, 15分, 46, b φ では60分, 30分, 30, c φ では55分, 40分, 27, であった。なお潜伏期における各宿主細胞に対する当該ファージの吸着率は a φ では90%, b φ では87%, c φ では98%であった。

一般的な海洋ファージの潜伏期は20~40分位であり, 放出量は100~300位であるが, それ

に比して供試ファージのそれらは潜伏期が長く、放出量は小さい。従って Fig. 1 に見られるように溶菌斑が小さいことがうなずける。

### 7. 抗ファージ血清による中和反応

供試ファージのそれぞれを免疫原として実験用ウサギに注射し、抗ファージ血清を作成した。まずそれら抗ファージ血清の抗原ファージに対する中和反応条件と中和率 (%) を測定し、その結果を Table 2 に示す。中和反応当初のファージ数  $10^6$  pfu/ml, 反応温度  $30^\circ\text{C}$  の条件において、各供試ファージは表中に記載の抗血清希釈率, 反応時間 (分) において中和率 90 ~ 99% 内に入る値を示した。すなわち [a] - a  $\phi$  では 96%, [b] - b  $\phi$  では 96%, [c] - c  $\phi$  では 93% であった。

**Table 2.** Rate of neutralization with antiphage-serum to homologous *V. harveyi*-phage.

<i>V. h</i> phage	Antiphage-serum	Condition of neutralization				Rate of neutral.
		$\phi$ titer (pfu/ml)	Serum-diln.	Temp. ( $^\circ\text{C}$ )	Time (min.)	
<i>V. h</i> -a $\phi$	[a]	$10^6$	1/1024	30	5	96
-b $\phi$	[b]	$10^6$	1/1024	30	10	96
-c $\phi$	[c]	$10^6$	1/64	30	20	93

**Table 3.** Cross neutralization rate (%) between *V. harveyi*-phages and their antiphage-sera.

<i>V. h</i> -phages	Antiphage-sera		
	[a]	[b]	[c]
<i>V. h</i> -a $\phi$	96	0	2
-b $\phi$	13	96	3
-c $\phi$	2	7	93

次に、Table 2 で確かめられた中和反応条件において、各供試ファージとそれに対応する各抗ファージ血清との交差中和実験を行なった。この実験は供試ファージ相互の類縁性を血清学的に検討するものである。その結果を Table 3 に示す。この表に見られるように、各供試ファージとその抗ファージ血清との間の中和率は 90% 以上を示しているが、その条件下で他の抗ファージ血清とファージ相互間においては数%の交差中和が見られたに過ぎない。この結果、供試 *V. harveyi*- a  $\phi$ , b  $\phi$ , c  $\phi$  は血清学的には類縁性が認められない。

これらファージを使って、分離 *V. harveyi* をファージ型別することによりその菌種を菌株レベルで鑑別しうる。それにより発光細菌の *V. harveyi* 菌株の分布動態をつぶさに調べ、各菌株の生態と海洋環境との関わりを解明する手段に供しうるものと考えられる。

## 要 約

鹿児島湾の海水や魚類から5ケ年間に分離された発光細菌 *V. harveyi*-ファージ系 (85系) はそれらの性状によって3つに群別された。各群を代表する3株のファージ (*V. h-a*  $\phi$ , *V. h-b*  $\phi$ , *V. h-c*  $\phi$ ) についてウイルス学的諸性状を検討した。その結果, 供試3ファージは粒子構造, 安定性などにおいて類似するものの, 宿主域, 溶菌斑形態, 一段増殖特性, 血清学的交差中和反応などにおいて三者三様に異なった性状を示し, 3つに群別する妥当性が認められた。これら3ファージを使って *V. harveyi* をファージ型別することによりその菌種をさらに細かく菌株レベルで鑑別できる。

## 謝 辞

本報において, 魚類の釣獲およびそれから細菌を分離する実験は, 当時の卒論学生であった森朝雄君の協力によって成されたものである。記して心からの謝意を表する。

## 文 献

- 1) 日高富男, 小林真澄 (1988) : 海洋発光細菌 *Vibrio fischeri* に感染するバクテリオファージの性状. 鹿大水紀要, **37**, 161-172.
- 2) N. R. Krieg and J. G. Holt(ed) (1981) : "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Vol. 1, pp. 516-550, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 3) 日高富男 (1983) : 鹿児島湾における発光細菌分布の季節変動. 沿岸海洋研究ノート, **21**, 19-28.
- 4) E. G. Ruby and K. H. Nealson (1978) : Seasonal changes in the species composition of luminous bacteria in nearshore seawater. *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 530-533.
- 5) T. Yetinson, and M. Shilo (1979) : Seasonal and geographic distribution of luminous bacteria in the eastern Mediterranean Sea and the Gulf of Elat. *Appl. Environ. microbiol.*, **37**, 1230-1238.
- 6) M. Shilo and T. Yetinson (1979) : Physiological characteristics underlying of luminous bacteria in the Mediterranean Sea and Gulf of Elat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 577-584.
- 7) M. A. Adams (1959) : "Bacteriophages", Interscience Publishers, Inc., New York.
- 8) D. E. Bradley (1966) : The fluorescent staining of bacteriophage nucleic acids. *J. Gen. Microbiol.*, **44**, 383-391.
- 9) 日高富男 (1983) : 海洋バクテリオファージの増殖に及ぼす培養温度と培地中無機塩の影響. 鹿大水紀要, **32**, 133-146.