

海底泥より分離したテンペレート・ファージ系の性状*

日 高 富 男**・白 浜 豊 宏***

Preliminary Characteristics of a Temperate Phage System Isolated from Marine Mud*

Tomio HIDAKA** and Toyohiro SHIRAHAMA***

Abstract

A temperate phage designated 07T-12P was induced from a lysogenic strain (07T-12L) isolated from Kagoshima Bay mud. The lysogenic strain is a monotrichous polarly flagellated marine *Pseudomonas* sp. The phage 07T-12P give turbid plaque with diameter in 2-3mm on the sensitive strain (07T-12S) in double agar layer plate. The electron micrograph of the phage particles shows that the structure of them has hexagonal and approximately 60 m μ in diameter head, and very small tail. The special character of the phage is to be very sensitive to heat and chloroform. When phage 07T-12P and strain 07T-12S were mixed at a MOI of 0.01 in sea water broth, there was 85-90 per-cent adsorption within 20 minutes at 25°C. The One-step growth curve of this phage shows that the latent period is 60 minutes, the rise period 35 minutes, and the average burst size is calculated to be 25 phage particles per infected cell. The phage yield was much lower. The cells of 07T-12L induced spontaneously the phage 07T-12P at a ratio of 0.8 per-cent of them. The phage induction rate of 07T-12L cells increased as high as 70-75 per-cent when they were irradiated ultraviolet light or treated with mitomycin C. On the other hand, when the phage 07T-12P was infected to 07T-12S cells at a MOI of 10, a 10-16 per-cent of the cells resulted in the lysogenic response and the others, a 84-90 per-cent of them resulted in the litic response. In this paper, the authors revealed the characteristics at the phases in the lysogenic cycle of the marine temperate phage system.

形質導入性をもつテンペレート・ファージ (temperate phage) とそのファージを産生する菌株, すなわち溶原菌株の存在はすでに BORDET (1925) により指摘されているが, 溶原性の真の姿を明らかにしたのは LOWFF ら (1950) である。これをきっかけに形質導入 (transduction), 溶原変換 (lysogenic conversion) などの現象が見出され, 微生物遺伝学や分子生物学において, ファージが関与する研究は目覚しい発展をもたらした。しかしそれらは主に *Escherichia coli*-ファージ系に関するもので, 他に *Salmonella* 属菌や *Bacillus* 属菌に対するファージなど陸棲ファージ系についてのものが多い。

ところで海洋細菌とそのファージ系については KRISS & RUKINA (1947), SPENCER (1955, 1960, 1963), CHAINA (1965), WIEBE & LISTON (1968), JOHNSON (1968), HIDAKA (1971), 日高 (1971a, 1973b) の研究がある。しかしそれらは主としてヴィルレント・ファージ (virulent

* 本研究の概要は昭和 47 年 10 月 日本水産学会秋季大会 (高知) で講演発表した。

** 鹿児島大学水産学部微生物学研究室 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

*** 現在: 大塚製薬株式会社徳島工場第一研究室 (Present address: The First Laboratory of Tokushima Factory, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

phage) についてのものであった。SMITH & KRUEGER (1954) は サンフランシスコ湾海底泥より溶原性 *Vibrio* 属菌株を分離し、同時に同じ試料から分離したファージがテンプレート・ファージであったことを報告している。KRISS ら (1967) は 1954 年から 1959 年までの 5 カ年間に海洋から収集した細菌 2,774 株のうち、752 株の培養物に溶菌現象を認めた。この現象をファージの溶原性と関係づけて論じている。しかしこれらの研究は海洋中のテンプレート・ファージの研究としてはその一端にふれたに過ぎない。

著者らは現在までに海水や海底泥から多数のファージ系を分離し (HIDAKA, 1971; 日高・藤村, 1971a; 日高 1973 b), 海洋ファージ系の特性を明らかにする (HIDAKA, 1972; 日高・藤村, 1971 b; 日高, 1973 a) とともに形質導入の可能性をもつテンプレート・ファージ系をも検索してきた。今回、鹿児島湾の海底堆積泥から溶原菌を分離することができ、その菌株からテンプレート・ファージを誘発しえた。そこでこのテンプレート・ファージ系を海洋細菌における形質導入の研究に資する目的で、そのファージ系の基礎的なウィルス学的性状や溶原サイクルの各過程における挙動を究明したのでその知見を報告する。

実験材料および方法

1. 分離源 供試ファージ系の分離源は、1970 年 7 月 1 日 米国ワシントン州立大学の研究船“トンプソン号”(1,300 トン) が鹿児島に寄港した際、同船のコア・サンプラーを用いて 鹿児島湾中央最深部 (31°26'N-130°39'E, 深度 230 m) から採取した海底堆積泥である。供試泥は採取後直ちに研究室に持ち帰り実験に供した。

2. 使用培地 供試細菌の増殖や供試ファージの増強には海水培地 (Sea Water Broth, SWB) を使用した。その培地は HERBST's 人工海水 1 l にポリペプトン 5 g, 酵母エキス 1 g を溶解して最終 pH 7.6~7.8 に調節したものである。また寒天斜面や寒天平板として使用する海水寒天培地 (Sea Water Agar, SWA) は、上記 SWB に寒天を 1.5 % 濃度に加えたものである。別に SWB に 0.5 % 濃度に寒天を加えたものを軟寒天培地 (soft Sea Water Agar, sSWA) として二重寒天平板法の接種層に使用した。なお HERBST's 人工海水の組成は NaCl 30, KCl 0.7, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10.8, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.4, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.0 g/l で、pH 7.6~7.8 に調節したものである。

3. 供試菌の分離と性状検査 供試海底泥を SWB で適宜 10^{-n} 希釈した液 0.1 ml を SWA 平板上に塗抹し、25°C で 6 日間培養した。かくて生育してきた集落を計数して試料中の細菌数を算出した。次いで単離集落のすべてを釣菌して SWA 斜面培地に移植、保存した。分離菌の性状検査は標準法 (HARRIGAN and McCANCE, 1966) で行ない、鑑別は BERGEY's Manual, 7 版 (BREED *et al.*, 1957) と、SHEWAN ら (HENDRIE and SHEWAN, 1966; BAIN and SHEWAN, 1968) によって要約された鑑別法によった。

4. 供試テンプレート・ファージ系の検出・分離 供試海底泥からの分離菌を SWB で培養し、その新鮮培養物を SWA 平板に塗抹して培養するうち、その菌苔に溶菌斑を生ずる培養物があるのを見出した。このことはその培養物中に非溶原性のファージ感受性細胞 (non-lysogenic, phage sensitive cells) と溶原細胞 (lysogenic cells) とが混在することを意味するものである。よってその両者を単細胞分離法によって分離した。分離された菌株が感受性菌であるかどうかは、その菌の SWA 平板培養物にファージ液をスポットして培養し、スポット部分の溶菌によってその感受性を確めた。また溶原菌であるかどうかは、その菌をファージ液および感受性菌とそれぞれ交叉画

線培養 (cross streak culture) し、ファージ液によって溶菌されずかつ感受性菌を溶菌する、すなわちそのファージに対して免疫されておりかつファージを産生する能力を備えていることを指標として溶原性を確認した。テンペレート・ファージは溶原菌の培養物中に自然誘発したものを無菌化して供試した。すなわち溶原菌の SWB 培養物を遠沈し、その上澄液をさらに Millipore filter (HA, 0.45 μ) で濾過除菌したものをファージ液とした。

5. ファージ滴定法 各試料のファージ数は ADAMS (1959) の記載に準じ、二重寒天平板法 (double agar layer method) による溶菌斑形成単位 (plaque forming units, p.f.u.) として滴定した。すなわち予め海水培地で適宜 10^{-8} 希釈を行なったファージ液に感受性菌新鮮培養物 (10^8 cells/ml) を等量混じ、25°C 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 を予め溶融し 45°C 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) 上に流込み重層する。重層寒天の固化するをまって 25°C にて 1 晩培養した。この方法で二重寒天平板に形成された溶菌斑を計数し p. f. u./ml を算出した。

6. 生菌数算定 供試菌の生菌数は適宜希釈した試料菌液 0.1 ml を SWA 平板に塗抹して 25°C で 1~2 日間培養し、生育した集落を数えて算出した。

7. 供試ファージの一段増殖実験 標示菌 (indicator strain) を SWB で 1 晩培養したもの 0.5 ml を 4.5 ml の SWB に移殖しさらに 2~3 時間培養する。その新鮮培養物 (10^8 cells/ml) 0.5 ml とファージ液 (10^6 p.f.u./ml) 0.5 ml とを SWB 4 ml 中に加え混和し——この時の感染度合 (multiplicity of infection, MOI) は 0.01 となる——吸着管 (adsorption tube) として 25°C で 20 分間培養する。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 (growth tube) としてひき続いて培養する。増殖管からは所定時間毎に試料の一部をとり出しファージ数を滴定し、放出ファージ数を知る。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 (infective centers) 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かつために Millipore filter (HA, 0.45 μ) 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 (adsorption rate) とした。

8. 溶原菌の誘発率測定 試験菌液を適宜二重寒天平板法で培養し、その間に現れる誘発現象をとらえて誘発率を算出した。まず、溶原菌試料中にはすでに前培養の段階で誘発された遊離ファージ (free phages) が含まれているのでその数を知る必要がある。そのため試料液を Millipore filter (HA, 0.45 μ) で濾過し、その濾液について遊離ファージ数を滴定する。次に誘発細胞数を知るため、溶原菌試料液を適宜希釈し、5 項で述べたと同様にして、感受性菌の新鮮培養液と混じて二重寒天平板法で培養し、その培養中に現われた溶菌斑を計数して全感染中心体数 (total infective centers) を知る。しかしこの全感染中心体数は誘発細胞数に前述の遊離ファージ数が含まれたものである。従ってこの全感染中心体数から上述の遊離ファージ数を差引いた値が誘発細胞数 (induction cells) となる。また試料中の溶原菌生菌数を寒天平板塗抹培養法で測定する場合、溶原細胞のあるものはその平板培養の途中で誘発溶菌して集落を形成しえず、生菌数に数えられない部分が生ずる。その部分は前述の誘発細胞数と同数である。従って寒天平板塗抹培養物に集落を形成した生

残菌数 (survival cells) に誘発細胞数を加えたものが試料液中の生菌数 (viable cells) となる。かくて算出された試料中の生菌数に対する誘発細胞数の百分率で誘発率 (induction rate) を表わした。

9. 電子顕微鏡観察 供試菌は SWA 平板上に塗抹培養した新鮮培養物を適量の1%酢酸アンモニウム水溶液に懸濁し、それをコロジオン膜をはり炭素蒸着したシートメッシュ上に塗布、乾燥した。次いでこれにクロムシャドウイング処理を施したものを電子顕微鏡標本として菌形の観察に供した。一方、ファージ粒子構造を観察するための標本は、1%酢酸アンモニウム水溶液に懸濁した濃厚ファージ液 ($10^9 \sim 10^{10}$ p.f.u./ml) を2%リンタングステン酸水溶液 (pH 7.2 に調整) と等量混和したものを前記と同様のシートメッシュに塗布・乾燥し、電顕用標本としてファージ粒子構造の観察に供した。電子顕微鏡は、日立製 HU-11D 型を使用し、細菌細胞形態は 5,000 倍で、ファージ粒子構造は 50,000 倍でそれぞれ観察した。

実験結果および考察

1. 溶原菌の単離と性状 供試海底泥 (含水量 73.6%) は約 10^4 cells/g の生菌数を含み、それから分離された培養物はそれらの性状から 22 菌株に整理された。それらに 07T-1~22 の符号を付して実験に供したが、そのうち 07T-12 が平板培養中に溶菌斑を現わすものであった。その培養物から単細胞分離法によって溶原細胞と非溶原性のファージ感受性細胞とに分ち、前者を 07T-12L, 後者を 07T-12S と符号した。

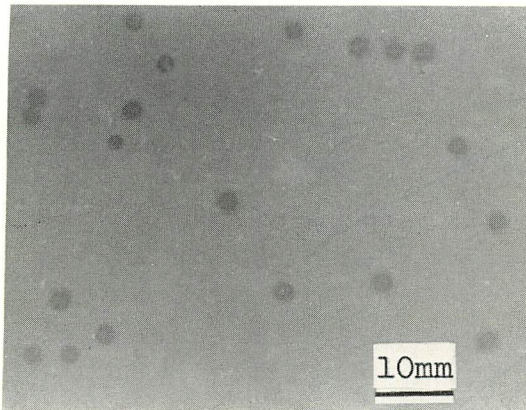
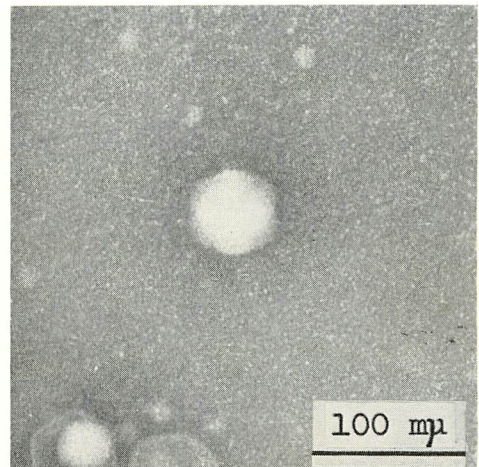
07T-12L と 07T-12S は溶原性有無の差のみで細菌学的レベルの性状は同じであった。その性状の概要は Table 1 に示される。これらの菌はグラム陰性菌で、その外形は Fig. 1 の電子顕微鏡写真に見られるようなやや彎曲した長桿状で単極毛をもつ。その大きさは $0.4\mu \times 1.6\mu$ であった。その他生化学的性状を SHEWAN らの分類法に照らしてみると Genus *Pseudomonas* に属する菌株であると考えられる。五種所定培地 (HIDAKA & SAKAI, 1968) による無機塩要求性は海洋型を示すが、発育至適温度はやや高く 30°C であり、 37°C においても発育し得る菌であった。

2. 誘発テンプレート・ファージの性状 溶原菌 07T-12L の SWB 培養物中に自然誘発しているファージを無菌化してファージ液として供試したが、この自然誘発ファージ液においてはほぼ 10^6 p.f.u./ml の滴定値を示した。このテンプレート・ファージを 07T-12P と符号して実験に供した。

Table 1. Brief characterization of the bacteria, 07T-12L and 07T-12S.

Cell form	Rod	Nitrate reduction	+
Gram's stain	—	H ₂ S from cysteine	+
Flagellation	Mono.	V. P. test	—
Kovacs oxidase	+	M. R. test	—
Hugh & Leifson test	NC	Luminescence	—
Sensitvity to 0/129	—	Pigments	—
Arginine dihydrolase	—	Growth in 7.5% NaCl	+
Gelatin hydrolysis	—	Growth at 37°C	+
Starch hydrolysis	—	M-, H-, T-type Typing	M-type
Indole production	—		

Key : +, positive; —, negative; Mono., Monotrichous; NC, growth with no change in reaction; M-type, Marine type

Fig. 1 Electron micrograph of 07T-12L cells, $\times 15,000$ Fig. 2 Plaque morphology of the temperate phage 07T-12P, $\times 1$ Fig. 3 Electron micrograph of 07T-12P particles negatively stained with phosphotungstic acid, $\times 200,000$

(1) 形態 溶原菌 07T-12L から誘発されたテンペレート・ファージ 07T-12P は 07T-12S を標示菌として二重寒天平板法で 25°C 、1晩培養した場合、Fig. 2 に示されるような溶菌斑を形成した。標示菌の菌苔が淡く半透明なので、溶菌斑の輪郭はやや不鮮明であるが、その溶菌斑形態は径約 $2 \sim 3 \text{ mm}$ の円形で、内部に同心円状に数重の混濁輪がみられる。この混濁輪の数は一定しておらず、感染時の条件や、菌とファージの力関係によって左右されることが観察された。一方このテンペレート・ファージの粒子構造は Fig. 3 のごとくである。すなわち径約 $60 \text{ m}\mu$ の外観六角形の多面体の頭部に、ごく微小な尾部をつけた構造である。このファージの遺伝物質は Acridine orange 染色法 (BLADLEY, 1966) によって 2 本鎖 DNA であることが知られ、このファージは TIKHONENKO (1970) のファージ群別法の III 型に属するものであることが明らかになった。

(2) 安定性 供試テンペレート・ファージ 07T-12P は増強しにくく、増強液の力価はせいぜい $10^6 \sim 10^7$ p.f.u./ml 程度であり、しかも非常に不安定なファージであることがうかがえた。

そこで、このファージ液を 10° , 30° , 45°C の各温度条件においた場合の失活度合を検討し、その結果を Fig. 4 に示した。まず、ファージ液調製当日の力価が 6×10^6 p.f.u./ml であるものを 10°C 冷蔵庫内で保存した場合、その力価は2日後に $1/2$ に、5日後に $1/10$ に、2週間後にほぼ $1/100$ にまで低下した。通常のファージ実験においては少なくとも 10^5 p.f.u./ml 以上の力価が必要であるので、このファージ液は10日に1度位の頻度で増強する必要がある。あるいはこのファージは溶原菌の状態で保存し、必要に応じ溶原菌からの誘発ファージを集めて実験に供するのが便利である。また 30°C においてもファージ力価の減衰がみられた。 30°C 静置条件では4時間後に $1/2$ に、8時間後に $1/3$ に、 30°C 振盪条件では4時間後に $1/3$ に、8時間後に $1/10$ に減少した。このように通常の培養条件においてすら産生ファージが失活する程に耐熱性低く、静置条件におけるよりも振盪条件においてその傾向は顕著である。供試菌 07T-12L の至適発育温度は 30°C であるが培養中誘発ファージの減衰をさけるため、本研究ではすべて 25°C で培養した。次にこのファージ液を 45°C で加温した場合の失活曲線によれば、その力価は5分後に $1/10$ に減じ、以後ゆるやかな曲線を描いて減じ30分後には $1/100$ に減少した。ところで、ファージ滴定の時、二重寒天平板法では 45°C に保温された sSWA 中にファージ液を混入し、それを基層寒天平板上に流込む操作があるが、その際ファージ試料が 45°C にさらされる時間はせいぜい10秒以内である。従って、このファ

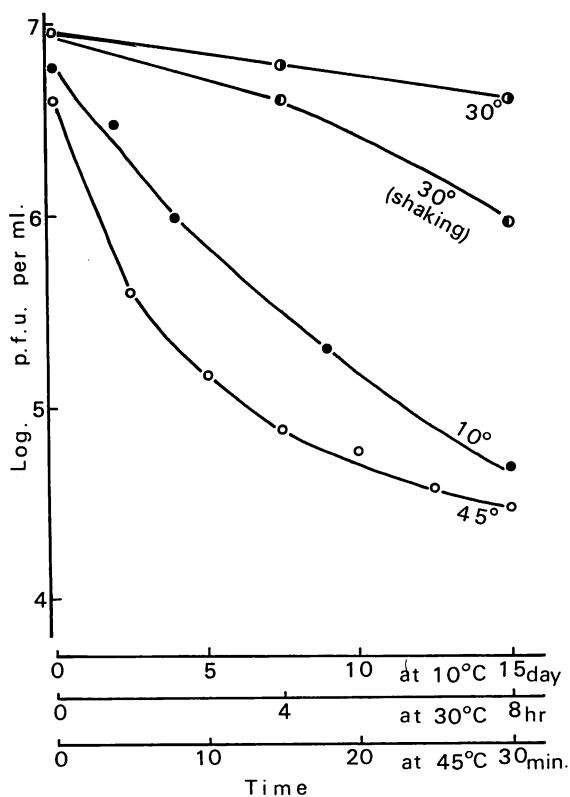


Fig. 4 Temperature sensitivity of the temperate phage, 07T-12P.

ージの耐熱性が低いと言うものの、二重寒天平板法における加温条件ではほとんど影響をうけないとみてよい。海洋ファージの耐熱性を知るための一応の目安とされている 50°C 、30 分間の加熱によって、このファージは完全に失活した。

一方、ファージ実験において、供試ファージがクロロホルム耐性であることはファージ取扱い手技においていろいろな便利さをもたらす。そこで 07T-12P のクロロホルム耐性をもあわせて検討した。SWB に懸濁したファージ液に 1/10 量のクロロホルムを添加し、1 分間程強く振盪した後、室温で 1 時間放置する。これを低速で遠沈し、上清液について生残ファージ数を滴定した。その結果、このファージの力価は完全に消失しており、07T-12P のクロロホルム耐性は認められなかった。

(3) 増殖 ファージの一段増殖実験 (one-step growth experiment) は、ファージの宿主菌体内増殖過程を知るための重要な実験である。すなわちファージ粒子が宿主細胞に感染する際の吸着率 (adsorption rate) や感染したファージが宿主細胞内で増殖し放出されるまでの潜伏期 (latent period)、また、ファージが放出されている期間である上昇期 (rise period) や感染細胞 1 個当り子孫ファージの平均放出量 (average burst size) などが同時に測定出来る。供試ファージの一段増殖曲線 (one-step growth curve) は Fig. 5 に示した。この曲線より供試テンペレート・ファージ 07T-12P の潜伏時は 60 分、上昇期が 35 分、平均放出量は約 25 であることが知られた。また吸着管にあって吸着時間 20 分後における全ファージ数と未吸着の遊離ファージ数より吸着率を計算すると 85~90% となる。このファージの特徴は潜伏期が長く、放出量が非常に小さいことである。このことは、このファージが増強しにくいことと関連づけてうなずける。

3. 供試宿主一ファージ系における溶原サイクル テンペレート・ファージと宿主菌との間には、溶原菌からのテンペレート・ファージの誘発や、その誘発テンペレート・ファージが非溶原性の感受性菌へ溶原化していくサイクルがあり、それを把握することはテンペレート・ファージを扱う上で重要なことである。

(1) 供試溶原菌の誘発 溶原菌はその対数増殖期には一定の割合 ($10^{-2} \sim 10^{-5}$ cell $^{-1}$ genera-

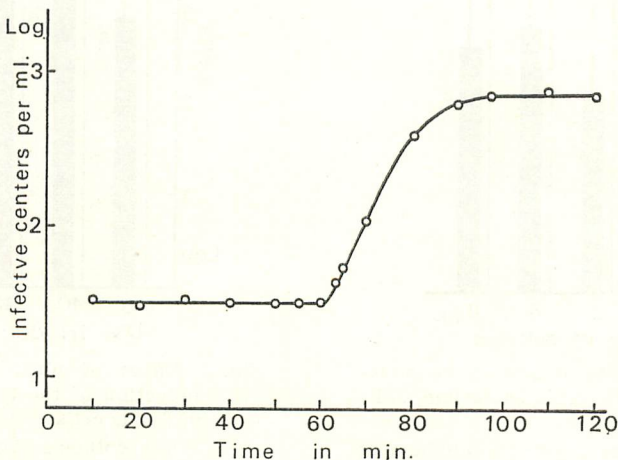


Fig. 5 One-step growth curve at 25°C with phage 07T-12P on 07T-12S in sea water broth.

Bacterial viable count, $10^7/\text{ml}$; MOI, 0.01

tion⁻¹)でプロファージ (prophage) を誘発・増殖してテンプレート・ファージを遊離する。また溶原菌のあるものは適量の紫外線 (ultraviolet light, UV) やマイトマイシン C (mitomycin C, MC) など作用させることにより、ほとんどすべての細胞で誘発溶菌がひきおこされることが知られている。そこで供試溶原菌 07T-12L の各条件下における誘発現象を調べた。

1) 自然誘発 SWB で1晩培養した 07T-12L 菌体を遠沈法で洗浄し、前培養液に含まれる自然誘発ファージをできるだけ除去する。その洗浄細胞を SWB に 10^5 cells/ml 程度接種し、25°C で振盪培養する。その培養物の培養令の異なる段階——培養 0, 2, 4, 8 時間——のものについてそれぞれの遊離ファージ数、全感染中心体数、生残菌数を測定し、生菌数、誘発細胞数および誘発率を算出した。その結果を Fig. 6 に示した。Fig. 6 にみられる各試料の生菌数より、この培養物は培養後2時間までの遅滞期を経て、対数増殖期に入り、培養8時間で対数期の末期にあるようである。一方誘発細胞数は培養初期培養令が進むにしたがってだんだん高まり、培養令4時間のもので最高値を示し、培養令8時間のものはそれより低くなっている。このことは溶原菌の培養物にあって、旺盛な発育を示す対数期の細胞が最も自然誘発しやすいことをしめした。ところで誘発率は培養令が進むに伴い低くなっていく。それは培養令の進行に伴う生菌数の伸びに比し、誘発細胞数の伸びが少ないため、率の低下をもたらしたものである。

2) 紫外線照射による誘発 07T-12L 菌の洗浄細胞を SWB に再懸濁し、生菌数が 10^5 cells/ml になるように調節する。この試料菌液 4.5 ml を内径 5.7 cm のシャーレーに採り、これを 15 W UV ランプから 63 cm 直下におき、試料菌液をゆるやかに振りながら所定秒数間 UV を照射し

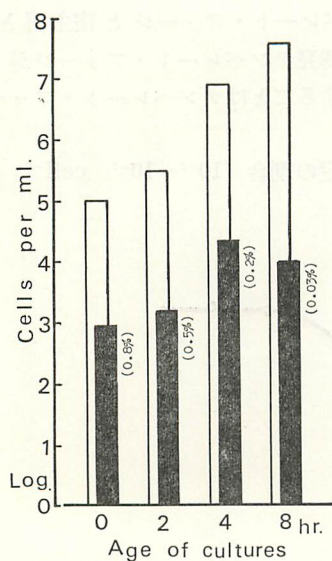


Fig. 6 Effect of cultural age on the induction of the lysogenic bacterium, 07T-12L cells.

White columns show the numbers of viable cells and black columns show the numbers of inducing cells. Numbers in parenthesis indicate the induction rate.

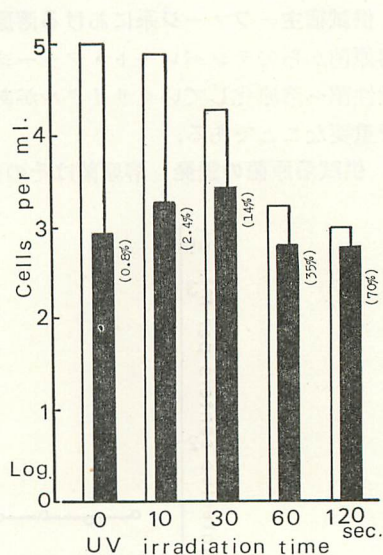


Fig. 7 Effect of ultraviolet light on the induction of the lysogenic bacterium, 07T-12L cells.

White columns show the numbers of viable cells and black columns show the numbers of inducing cells. Numbers in parenthesis indicate the induction rate.

た。この条件において試料菌液の液深は 1.8 mm である。所定時間 UV 照射した試料液についてそれぞれ遊離ファージ数、全感染中心体数、生残菌数を測定し、生菌数、誘発細胞数および誘発率を算出した。その結果を Fig. 7 に示した。予備実験において、UV 照射 180 秒間位の範囲まではこのファージ、07T-12P の力価に何らの影響をもおよぼさないことが明らかにされている。これに対し、供試溶原菌 07T-12L の細胞は UV 照射によって急激に死滅してゆく。Fig. 7 にみられるごとく 10 秒間照射によってすら生菌数は 72 % に減じ、30 秒間照射で 18 % に、120 秒間照射では 1 % に、つまり 99 % は死滅していることになる。他方、誘発細胞数は UV を照射しなかった対照試料においては 8.5×10^2 cells/ml であったが、UV を照射することにより徐々に増加し、30 秒間照射の試料において最高の 2.8×10^3 cells/ml であった。それより長い時間 UV 照射した試料ではかえって誘発細胞数は減少した。これは UV により試料中の生菌数つまり誘発すべき細胞の母数が大きく減少しているからである。これらの値に基づき誘発率を求めると、UV を照射しなかった対照試料のそれは 0.8 % であり、UV 10 秒間照射試料では 2.4 %、30 秒間照射試料では 14 % となった。UV 120 秒間照射試料では前述のごとく溶原菌細胞の 99 % が死滅した状態であるが、そこに生き残った細胞の 70 % は誘発することが明らかである。このことは UV によって死滅しなかった生残細胞においても、それらの大部分はファージ誘発を起こすにふさわしい非致死的な作用を被っていることが考えられる。

3) マイトマイシン C 処理による誘発 MC を 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 ppm 含む SWB に、供試溶原菌 07T-12L の洗浄細胞を接種 (10^5 cells/ml) し 25°C で 4 時間振盪培養した。その後各培養物の遊離ファージ数、全感染中心体数、生残菌数を測定して、生菌数、誘発細胞数および誘発率を算出した。その結果を Fig. 8 に示した。この実験に供した程度の MC 濃度は供試ファージ粒子に対して失活作用がないことを予め確かめてある。ところで Fig. 8 に示されるように供試溶原菌の発育は試験 MC 濃度の増加につれ、徐々に抑制され、MC 濃度が 0.5 ppm 以上ではむしろ明らかな殺菌作用が認められる。誘発細胞数は、MC 濃度 0~0.1 ppm の範囲内では大差ない。ただ MC 0.05 ppm 処理物での誘発細胞数は MC 処理しない対照物のそれの 2~3 倍程度に高い値を示している。MC 濃度 0.5 ppm 以上では誘発細胞は対照のそれよりむしろ低下している。一方誘発率は試験範囲内においてより高い MC 濃度で処理したもののほど高い値を示しているが、これは誘発率を計算する母数 (生菌数) の減少に依存するものである。ともあれ、MC も

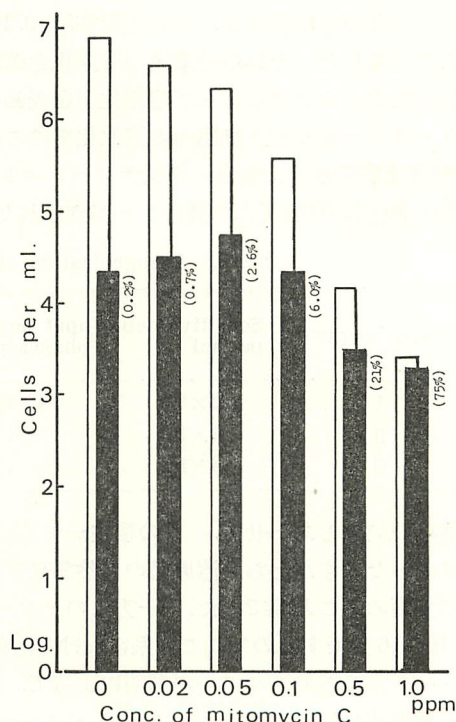


Fig. 8 Effect of mitomycin C on the induction of the lysogenic bacterium, 07T-12L cells.

White columns show the numbers of viable cells and black columns show the numbers of inducing cells. Numbers in parenthesis indicate the induction rate.

供試溶原細胞に対し発育抑制因子として作用し、かつ誘発可能な刺激を与えているものと考えられる。

供試溶原菌の誘発因子として UV 照射と MC 処理を試験したが、その至適条件での作用によってそれぞれの対照に比し 2～3 倍程度の誘発細胞数の増加がもたらされた。また試料菌液の生菌数に対する誘発細胞数の率は、UV 照射および MC 処理によって共に著しく高まった。これには計算の母数（生菌数）の減少が関連しているが、同時に UV 照射、MC 処理によって生き残った細胞の大部分は誘発してくるという現象が確認された。

(2) 供試テンペレート・ファージの感受性細胞に対する溶原化反応 感受性菌にテンペレート・ファージが感染した場合、その感染菌体内でファージが増殖して溶菌をおこす（溶菌反応 lytic response）か、あるいは感染菌体内に注入されたファージ核酸が菌染色体にくみこまれてそのまま宿主菌は生存し続ける（溶原化反応 lysogenic response）か、いずれかの方向に進む。これらのいずれの反応に進むかは、宿主—ファージ間の特異的な現象であり、その割合は感染時の条件を一定にすることによって決ってくる。そこで供試テンペレート・ファージの性状の一つとして感受性細胞に対する溶原化率を求めた。すなわち、感受性細胞 07T-12S の 1 晩培養物を $10^5 \sim 10^6$ cells/ml に希釈し、それにファージ 07T-12P を MOI 10 程度になるように混和し 25°C、3 時間ゆるやかに振りながら培養する。その後混和液 0.1 ml を SWA 平板に塗抹培養して現われる集落の全部を釣菌分離した。それら分離菌の溶原化を確認し、溶原化が認められた菌数の最初に加えた感受性菌数に対する百分率によって溶原化率を表わした。その結果を Table 2 に示した。供試テンペレート・ファージの宿主細胞への溶原化率はこの実験条件において 10～16% であった。よって MOI 10 程度で感染させた場合、供試テンペレート・ファージ感染菌の 10～16% が溶原化反応に、残りの 84～90% が溶菌反応に進むことが知られた。

Table 2. Lysogenization of 07T-12P to sensitive cells, 07T-12S.

Experiments	Sensitive cells per ml	Input temperate phages per ml	MOI	Lysogenic cells per ml	Lysogenization rate (%)
I	5×10^5	4×10^6	8	8×10^4	16
II	1×10^6	1×10^7	10	1×10^5	10
III	4×10^5	5×10^6	11	4×10^4	10

前項の結果とあわせて、この宿主—テンペレート・ファージ系の溶原サイクルの様相がほぼ明らかになった。すなわち、溶原菌の自然誘発率は 0.8% であり、それは UV 照射または MC 処理によって高めることができた。一方このテンペレート・ファージが感受性細胞を溶原化する率は、ほぼ 10～16% であるので、この系における溶菌反応は 84～90% である。かかる供試テンペレート・ファージ系の溶原サイクルの解明によって、適当なマーカーを選び、それに相応する供与菌と受容菌を整理すれば、このテンペレート・ファージ系を使って供試海洋性 *Pseudomonas* 属菌株相互の形質導入実験が可能であることを認めた。

要 約

鹿児島湾の海底泥より溶原菌を分離し、その菌からテンペレート・ファージを誘発した。分離溶原菌は *Pseudomonas* に属する海洋細菌である。この溶原菌より誘発されたテンペレート・ファ

ージの感受性細胞に対する溶菌斑形態は径 2～3 mm の正円形で、その内部に数重の混濁輪が認められる。またそのファージ粒子構造は、径 60m μ の外観六角形をした多面体の頭部と微小な尾部からなっている。このファージの生理学的性状の特色は非常に不安定であることで、そのファージ液を 10°C で保存する場合約 10 日間で使用にたえなくなり、また加熱およびクロロホルム処理によっても容易に完全失活する。次にこのテンペレート・ファージを感受性菌に対し MOI 0.01 で混和した場合、20 分間で 85～90 % の吸着率を示した。このファージの感染菌体内での増強のあり方は、その一段増殖曲線より潜伏期 60 分、上昇期 35 分そして平均放出量は 25 であることが知られた。

供試溶原菌は液体培養中で通常 0.8 % の率で自然誘発を起こしテンペレート・ファージを放出するが、UV 照射あるいは MC 処理することにより誘発率を高めることが出来る。一方この誘発テンペレート・ファージを感受性細胞に対して MOI 10 で感染させると、その 10～16 % の割合で溶原化細胞が現れ、残りの 84～90 % が溶菌反応に向う。

以上、分離溶原菌の誘発、誘発されたテンペレート・ファージの性状、およびそのファージの感受性菌への溶原化など、供試海洋性テンペレート・ファージ系の溶原サイクルの各過程における性状を把握しえた。これらの結果より、このテンペレート・ファージ系を使って供試海洋性 *Pseudomonas* 属菌株相互の形質導入実験が可能であることを認めた。

文 献

- ADAMS, M. A. (1959): "Bacteriophages", Interscience Publishers, Inc., New York.
- BAIN, N. and J. M. SHEWAN (1968): Identification of *Aeromonas*, *Vibrio* and related organisms, in "Identification Methods for Microbiologists, Part B" (B. M. GIBBS and D. A. SHAPTON, ed.), 79-84, Academic Press, New York.
- BORDET, J. (1925): Le problème de l'autolyse microbienne transmissible ou du bactériophage. *Ann. Inst. Pasteur*, 39, 711.
- BRADLY, D. E. (1966): The fluorescent staining of Bacteriophage nucleic acids. *J. gen. Microbiol.*, 44, 383-391.
- BREED, R. S., E. G. D. MURRAY, and N. R. SMITH (1957): "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7th ed., Wilkins Co., Baltimore.
- HARRIGAN, W. F. and M. E. McCANCE (1966): "Laboratory Methods in Microbiology", Academic Press, New York.
- HENCRIE, M. S. and J. M. SHEWAN (1966): The identification of certain *Pseudomonas* species, in "Identification Methods for Microbiologist, Part A" (B. M. GIBBS and F. A. SKINNER, ed.), 1-7, Academic Press, New York.
- HIDAKA, T. and M. SAKAI (1968): Comparative observation of the inorganic salt requirements of the marine and terrestrial bacteria. *Bull. Misaki Marine Biol. Inst. Kyoto Univ.*, No. 12, 125-149.
- HIDAKA, T. (1971): Isolation of marine bacteriophages from sea water. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 37, 1199-1206.
- 日高富男・藤村剛 (1971 a): 海洋バクテリオファージの形態について。本誌, 20(1), 141-154.
- 日高富男・藤村剛 (1971 b): 海洋バクテリオファージの熱およびクロロホルム耐性。本誌, 20(1), 155-158.
- HIDAKA, T. (1972): On the stability of marine bacteriophages. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38, 517-523.
- 日高富男・一田謙一 (1972): 海洋バクテリオファージの細菌濾過膜通過による損失。本誌, 21(1), 97-102.
- 日高富男 (1973a): 海洋バクテリオファージの特性。海洋科学, 5, 612-618.
- 日高富男 (1973b): 新たに分離した海洋バクテリオファージの性状。本誌, 22(1), 47-61.
- KRISS, A. E. and E. A. RUKINA (1947): Bacteriophage in the sea. *Rept. U.S.S.R. Acad. Sci.*, 57, 833-836.
- LWOFF, A., SIMINOVITCH, L., and KJELDGAARD, N. (1950): Induction de la production de bacté-

- riophages chez une bactérie lysogène. *Ann. Inst. Pasteur*, **79**, 815.
- SMITH, L. S. and A. P. KRUEGER (1954): Characteristics of a new *Vibrio*-bacteriophage system. *J. gen. Physiol.*, **38**, 161-168.
- SPENCER, R. (1955): A marine bacteriophage. *Nature*, **175**, 160-161.
- SPENCER, R. (1960): Indigenous marine bacteriophages. *J. Bacteriol.*, **79**, 614 only.
- SPENCER, R. (1963): Bacterial viruses in the sea, in "Symposium on Marine Microbiology" (C. H. OPPENHEIMER, ed.), 350-365, Charles. C. Thomas, Springfield, Illinois.
- TIKHONENKO, A. S. (1970): "Ultrastructure of Bacterial Viruses" (Translated from Russian by B. HAIGH), 29-32, Plenum Press, New York.
- WIEBE, W. J. and J. LISTON (1968): Isolation and characterization of a marine bacteriophage. *Marine Biol.*, **1**, 244-249.