ビワがんしゅ病菌ファージの純化

佐古宣道*・野村光幸**

Nobumichi SAKO* and Mitsuyuki NOMURA** : Purification
of *Pseudomonas eriobotryae* phage

Abstract

Pseudomonas eriobotryae phage (EP₁) was precipitated from crude phage suspension by addition of 8% polyethylene glycol 6,000 and 0.5M NaCl. The concentrated phage suspension was then purified by differential centrifugation and sucrose density gradient centrifugation. The antisera from rabbits immunized with the purified phage showed a titer of 1/2,048 by a precipitin test.

植物ウイルス罹病葉の汁液にポリエチレングリコール (PEG) を加えると、ウイルスは沈殿することが明らかにされて以来¹⁾, PEG 沈殿法は植物ウイルス純化の一手法として応用されるようになってきた^{2, 3, 4)}。一方, Yamamoto⁵⁾ らは大腸菌や *Salmonella* 菌などのファージが PEG によって沈殿し、濃縮できることを報告した。

本報では植物病原細菌であるビワがんしゅ病菌のファージが PEG の添加によって沈殿することを明らかにし、さらにしょ糖密度勾配遠心法を用いて同ファージの純化を試み、その抗血清を作製したので、これらの結果について報告する。

供試材料はビワがんしゅ病菌 (*Pseudomonas eriobotryae* (Takimoto) Dowson の系統 NAE-39 とその EP₁ ファージであった。ファージ増殖用培地としては入培地 (ペプトン5g, 塩化ナトリウム2.5g, 純水1,000ml, pH7.0) を用い、その120~150ml に半合成ジャガイモ寒天培地上で25C, 18時間培養して得られた細菌の浮遊液 2 ml (10⁷⁻⁸ Cells/ml) とファージ浮遊液 1 ml (10³⁻⁴ PFU/ml) とを接種し25Cで24時間振とう培養を行なった。この培養液を 8,500rpm

(マルサン 9B-3ローター), 15分間遠心分離し、得られた上清液に塩化ナトリウムを 0.5M になるように添加、溶解した。この液を 5 区に分け、2, 4, 6, 8, 10% (W/V) の各種濃度になるように PEG (MW6,000) をそれぞれ加え、かく拌しながら溶解後、4 C に60~90分間静置した。その後、各液を 8,500rpm, 15分間遠心分離し、上清液と沈殿部分とを別々に採取し、後者は Cavfch 培地 (casein hydrolysate 10% 溶液, vitamin free 2 ml, 塩化ナトリウム0.5g, 純水1,000 ml, pH6.8~7.0) に再浮遊した。この再浮遊液と上清液中のファージ数を溶菌斑計数法によって定量し、次の式に基づいて各種濃度の PEG によるファージ沈殿率を求めた。

ファージ沈殿率(%) =

$$\frac{\text{沈殿部分中のファージ数}}{\text{沈殿部分中のファージ数} + \text{上清液中のファージ数}} \times 100$$

得られた結果を Fig. 1 に示した。この結果から明らかに、添加 PEG の濃度が増すとともに、ファージ沈殿率は上昇する傾向が認められ、8% PEG では 90~95% のファージが沈殿し、この濃度が最適の条件

* 佐賀大学農学部 Faculty of Agriculture, Saga University, Saga, Japan.

** サンケイ化学株式会社 Sankei Chemicals Co. Ltd., Kagoshima, Japan.

1) Hebert, T. T. (1963). Phytopathology 53:361-366. 2) Kojima, M. and Murayama, D. (1972). Ann. Phytopath. Soc. Japan 38:431-433. 3) Hsu, H. T. and Black, L. M. (1973). Phytopathology 63:692-696. 4) 匠原監一部・尾崎武司 (1974). 日植病報40:265-267. 5) Yamamoto, K. R., Alberts, B. M., Benzinger, R., Lawhorne, L. and Treiber, G. (1970). Virology 40:734-744. 6) 佐古宣道 (1973). 日植病報 39:142 (講要). 7) 森田 昭 (1974). 日植病報40:401-411.

Fig. 1. Precipitation of *Pseudomonas erioibotryae* phage (EP₁) after adding of various concentrations of polyethylene glycol 6,000.

と考えられた。従って、以後の沈殿操作は8%PEG, 0.5M塩化ナトリウムの添加によって行なった。なお, Yamamoto⁵⁾らは PEG の添加最適濃度はファージの形態や大きさに左右されることを示唆しているが, 本ファージと類似の形態や大きさをもつカンキツかいよう病菌 (*Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson) の CP₁ファージもこの条件下でもっとも良く沈殿した⁶⁾。この PEG 沈殿法によって濃縮したファージ液は8,500 rpm, 15分間ならびに 33,000rpm (日立 RP 55ローター), 60分間の分画遠心を行ない, しょ糖密度勾配遠心に供試した。

しょ糖密度勾配の作製は 0.1M 塩化ナトリウム溶液を用いて 40, 30, 20, 10%の各種濃度のしょ糖溶液を作り, 遠心用チューブ (日立 RPS 40ローター用) にこれらの溶液を 1.1, 1.1, 1.1, 1.0ml ずつ順次重層後, 4°C に24時間静置して行なった。その後, チューブの最上層に 0.2ml の濃縮ファージ液 (10^{13} PFU/ml) を重層して, 55P 形日立分離用超遠心機によって26,000rpm, 60分間遠心した。分画はグラディエーター (ミツミ科学産業KK製) により行ない, 得られた32本の分画中のファージ数を溶菌斑計数法によって定量しその結果を Fig. 2 に示した。なお, ファージは遠心用チューブ (全長 4.2cm) の底面から 1.2~1.3cm の位置に乳白色の沈降帯を形成した。Fig. 2 に明らかなように, 最多数のファージ数を示した分画22番とこの前後の分画20~24番を合せて得られた液を33,000rpm (日立 RP 55ローター), 60分間遠心分離し沈殿物を生理的食塩水に再浮遊した。その後, 再浮遊液を8,500rpm

Fig. 2. Titer of *Pseudomonas erioibotryae* phage (EP₁) in fractions recovered from density gradient column after centrifugation.

m, 15分間遠心分離して, その上清液を純化ファージ液とした。ファージの形態は純化ファージ液をマイクログリット上にのせホルマリン固定, クローム蒸着を施したのち, 電子顕微鏡 (日立電子KK製100B) で観察し, 電顕像は Fig. 3 に示した。EP₁ファージは直径

Fig. 3. Electron micrograph of purified preparation of *Pseudomonas erioibotryae* phage (EP₁). $\times 35,000$.

105nmの頭部と長さ170nmの尾部からなり, その尾部の先端に数本のテールファイバーをもっており, 森田⁷⁾の dip 法による観察結果とはほぼ同じであった。純化ファージ液には夾雑物の混入はほとんどみられなかった。

つぎに, 抗ファージ血清作製の目的で, 前記と同一条件下で 31 の培養液から純化を行なった結果, 2ml (10^{10} PFU/ml) の純化ファージ液が得られた。このファージ液の0.7ml に等量のアジュバント (ドラケオ

ール6 VR 9: アラセルA 1)を加えてよく混合し、この乳化液を2頭のウサギの筋肉内に1週間々隔で4回注射した。最後の注射から1週間目に全採血し、得られた血液から常法によって抗血清を採血した。抗血清の力価は重層法によって測定した結果、両区とも2,048倍であり、この抗血清は一段階増殖実験に使用できると思われる。

以上の結果から、本純化法は簡便で温和な方法として類似の形態や大きさをもつ他の植物病原細菌ファージの純化やその抗原の調製に応用できると思われる。

本実験を行なうに際し、ビワがんしゅ病菌ならびにファージを分譲して頂いた長崎県果樹試験場森田 昭技師に深謝の意を表する。

(1976年5月6日受理)