Bacillus megaterium と Bacillus subtilis との間に おけるファージ感受性の型転換について

日本医科大学生物学教室

福 田 重 夫

Shigeo Fukuda

細菌の型転換とは、ある特定の形質がその菌株から抽出した高分子のデオキシリボ核酸 (DNA) によつて近縁の他の菌株に遺伝的に移される現象である。これまでの報告では、すべての細菌のあらゆる形質を転換できるというのではなく、肺炎球菌のほか、インフルエンザ菌、大腸菌及び枯草菌などで、その形質は荚膜の血清学的性状、薬剤耐性、集落形態及び代謝活性などに限られており^{1,2)}、バクテリオファージに対する耐性菌が感受性菌から抽出した DNA によつて型転換をおこし、その宿主となる現象については未だ報告されていない。

著者は *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* の培養液から分離したファージ S-a が枯草菌型に属する細菌のうち、強力にアミラーゼを生産する菌株のみを宿主とすること、リゾチーム処理によつてえたプロトプラストに対しても未処理の細胞における場合と同様に増殖することなどを明らかにしてさきに報告したが^{3,4)}、またファージと宿主細菌との相互作用を調べているうちにファージ感受性菌 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* の抽出液をファージ耐性菌の一種 *Bacillus megaterium* *roseus* に加えて培養すると、ものと菌株と著しく形質を異にした変異株の現われることを見出し、しかもそのうちの一白色変異株はファージ S-a に対して感受性を獲得し、宿主となることを認めたのでこれを報告した⁵⁾。その後抽出した高分子 DNA を精製し、ファージ耐性菌に加えても同様の現象がおこることを確かめ、えられた変異株についても 2~3 の性質を明らかにしたのでここに報告する。

実験方法

供試菌株

DNA 供与菌として *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* (ファージ感受性菌) *Bacillus subtilis* NR RL 558 (ファージ耐性菌) *Bacillus mesentericus* *vulgatus* (ファージ耐性菌) *Bacillus* sp. (Transformant R 11) などを用い、受容菌には *Bacillus megaterium*

第1図 デオキシリボ核酸 (DNA) の分離と精製法

roseus (ファージ耐性菌) を選んで用いた。

培 養 法

各菌株を肉汁培地に接種し 37°C で 16~17 時間前培養した後これを新鮮な肉汁に移し、供与菌は4~5時

第1表 型転換によつてえた変異株の諸性質 (肉汁培地: 37°C)

Donar strain	Receptor	Bacillus megaterium roseus					
	Charact.	Colony colour	Colony type	Lysozyme** sensitivity	Phage susceptibility	Amylase activity	Antisera of B.sub. amylo.
Bac. subtilis var. amyloliquefacus	Brown	Brown	Smooth	—	—	—	—
	Yellow	Yellow	Smooth	—	—	—	—
	White	White	Smooth*	+	+	+	+
			Rough	—	—	—	—
Bac. subtilis NRRL 558	Yellow	Yellow	Smooth	—	—	—	—
	White	White	Smooth*	+	—	—	—
Bac. mesentericus vulgatus	White	White	Smooth*	+	—	—	—
			Rough	—	—	—	—
Transformant R 11	White	White	Smooth*	+	+	+	±
			Rough	—	—	—	—

* これは供与菌のもつての形質の一部を獲得した菌株である。

** リゾチームは Alderton の方法(10)にしたがつて鶏の卵白から調製し、再結晶させて用いた。

アミラーゼ価は肉汁中に 37°C で 16~18 時間培養してその濾液を Wohlgmuth 法によつて測定した。

Bac. subtilis var. amyloliquefacus の抗血清は菌体をウサギに注射して、それから調製したものを用いた(3)。

間振盪培養を続け、集菌、洗滌してから高分子 DNA を抽出する試料とした。受容菌は肉汁に移してから 7~8 時間振盪を続けた後これに DNA 標品を加え、一定時間毎にその一部をとり、適当な細菌数に希釈してから肉汁寒天平板に播種し、37°C に 24~48 時間放置して変異株の集落を発生させた。またバクテリオファージに対する感受性の検定は Adams の寒天重層法にしたがつて行つた⁹⁾。

高分子 DNA の抽出、精製法

高分子 DNA の抽出、精製については、これまでに種々の方法が報告されている^{7,8)}。しかし、予備実験によれば、溶菌のためにリゾチーム処理をするよりもデオキシコール酸ソーダを用いた方が夾雑物を除去するために都合がよいので、Zamenhof 等の方法⁹⁾を変更して第1図に示す方法にしたがつて行つた。このようにしてえた DNA 標品は 1 M 食塩水に溶解し、紫外部における吸光度を測定してみると 258~260 mμ に最大吸収をもっており、また常法によつて無菌試験を行い、どのような細菌の生細胞をも含んでいないことを確認してから使用した。

実験結果

変異株の諸性質

上記の方法によつて供与菌から抽出、精製した DNA 標品と受容菌 *Bacillus megaterium roseus* とを接触させた場合は種々の変異株がえられた。これらの変異株について 2~3 の性質を調べた結果は第1表に示す通りであるが、特に *Bacillus subtilis* var. amyloliquefacus より調製した DNA 標品を与えたとき

きに発生した一白色変異株 Transformant R 11 はファージ S-a やリゾチームに対して感受性を示し、アミラーゼ生産能も現われてその形質の一部を獲得していることが認められた。Transformant R 11 は DNA 標品を与えてから約 8~10 時間後に出現し、その頻度は培地中に DNA を 20~40 μg/ml 含むときは (Webb and Levy の方法¹¹⁾によつて測定した) ほぼ一定であつて $10^3 \sim 10^4$ 細胞数/ml について約 1 細胞の割合であり、これは数代にわたつて継続培養しても獲得した形質を喪失することがなく、この Transformant R 11 より DNA 標品を調製して再び *Bacillus megaterium roseus* に与えたときも全く同様に変異することがわかつた。しかし *Bacillus mesentericus vulgatus* より調製した DNA 標品を同濃度に与えたときは極めて高い頻度で変異はおこつたが、これらはいずれもファージ耐性菌であつた。また、各供与菌から調製した DNA 標品に DNase (2 mg/ml 濃度, N.B.C 会社製) を 37°C, 10 分作用させてから与えたときは全く変異がおこらなかつた。*Bacillus megaterium roseus* を肉汁に培養したとき自然に発生する白色変異株の頻度は極めて低く、 $10^8 \sim 10^9$ 細胞数/ml について約 1 細胞の割合であり、この菌株はファージ S-a に対して耐性を示すことから、これまでのべたような種間の変異を誘発させる因子は高分子 DNA によるものと思われる。

Transformant R 11 の形状

予め細菌を肉汁に 37°C で 16~17 時間前培養した後これを再び新鮮な肉汁に移し、4~5 時間振盪培養

してから位相差顕微鏡によつて菌体の大きさを測定した。その結果 DNA 供与菌 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* は約 $2.0 \sim 3.0 \times 0.8 \sim 1.2 \mu$ であり、受容菌 *Bacillus megaterium roseus* は約 $3.5 \sim 4.5 \times 1.1 \sim 1.5 \mu$ であつたが、ここにえられた Transformant R 11 は丁度その中間の $2.8 \sim 3.8 \times 1.0 \sim 1.3 \mu$ の大きさであつた。

リゾチームに対する Transformant R 11 の感受性

Weibull はファージ C と宿主細菌 *Bacillus megaterium* との相互作用について、リゾチームに対する感受性とファージの吸着能との間に直接的な関係が見出されると報告している¹²⁾。そこで著者は Transformant R 11 にリゾチームを作用させてその溶菌状態を調べた。すなわち、肉汁に 37°C で発育させた対数期の細胞を遠心によつて集菌、洗滌し、 0.2 M 蔗糖を含む 0.1 M 磷酸塩緩衝液 (PH 7.0) に懸濁させた後 ($2.1 \sim 2.3 \times 10^8$ 細胞数/ml) これに 0.5% の濃度になるようリゾチームを加えて室温で反応させ、光電光度計によつて濁度の減少を求めた。その結果は第 2 図に示すように受容菌 *Bacillus megaterium roseus* は対照実験と

第 2 図 リゾチームによる各細菌の溶菌作用。 0.2 M 蔗糖を含む 0.1 M 磷酸塩緩衝液 (PH 7.0) に細菌を懸濁し、これに 0.5% の濃度になるようリゾチームを加えて室温で作用させ、 $660\text{ m}\mu$ のフィルターを用いて濁度の減少を測定した。

第 3 図 Transformant R 11 と *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* の両菌株に対するファージ S-a の吸着率 ($P/B=0.91$, 肉汁中 37°C で行った)。

第 4 図 Transformant R 11 と *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* に対するファージ S-a の one-step 増殖実験 ($P/B=0.8 \sim 0.82$ 肉汁中 37°C で行った)。

比較してなんらの変化も認められなかつたが Transformant R 11 は DNA 供与菌 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* とほぼ同程度に溶菌をおこなうことがわかつた。

Transformant R 11 に対するファージの吸着と one-step 増殖実験

Transformant R 11 は DNA 供与菌 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* と比較してファージ S-a の吸着能や増殖の様式にどの程度の相違があるかを調べてみた。先づ、宿主に対するファージの吸着は発育の対数期にある細菌を $4.5 \sim 4.7 \times 10^8$ 細胞数/ml に調節し、これに $3.8 \sim 4.3 \times 10^8$ 粒子数/ml の力価をもつファージ液を等量混合 (P/B=0.84~0.91) して 37°C で吸着させ一定時間毎にこの試料をとり、急冷して 10.000 g 15 分遠心した後上澄液中に含まれている未吸着のファージ数を測定し、これより吸着されたファージ数を算出した。その結果は第 3 図に示すように、両菌株とも吸着は 10 分間でほぼ最高に到達したが Transformant R 11 は *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* に比較してその速度が遅く、また吸着率も約 10 % 低いことがわかった。次に One-step 増殖実験は、発育の対数期にある細胞を $2.8 \sim 3.0 \times 10^8$ 細胞数/ml に調節してその 9.9 ml に、 $2.3 \sim 2.4 \times 10^{10}$ 粒子数/ml の力価をもつファージ液 0.1 ml を加え (P/B=0.80~0.82)、37°C で 10 分間吸着させた後この混液から一定時間毎に試料をとって適当に希釈し寒天重層法によつてファージの増殖過程を調べた。その結果は第 4 図に示すように Transformant R 11 におけるファージの潜伏期は 25~30 分であつて *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* に比較して殆んど変りはなかつたが、上昇期は 35~60 分でやや遅いことがわかった。しかし、両菌株とも 60~70 分で定常期に到達し、その平均放出価は約 100 の値を示した。

考 察

これまでにバクテリオファージに対する耐性菌が感受性菌から抽出した DNA によつて型転換をおこし、その宿主となる現象については未だ報告されていなかった。

著者はファージ S-a の宿主範囲が枯草菌に属する細菌のうち、強力にアミラーゼを生産する菌株のみに限られているという事実から、ファージと宿主との間の特異性を調べる目的でファージ S-a に感受性を示す *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* の無細胞抽出液を枯草菌に属する他のファージ耐性菌に与え、その感受性変異株を分離しようと試みたが困難なため、紅色のファージ耐性菌 *Bacillus megaterium roseus* を選んで実験した。その結果種々の変異株を分離することに成功した。しかも、それらの変異株のうち、白色で円滑な集落を形成する菌株はファージ S-a に感受性を示し、その宿主となることを認めたのでこれを報

告した⁵⁾。その後数種の細菌から高分子 DNA を抽出、精製して同様の実験を反覆してみたが、無細胞抽出液を与えたときと全く同様に種々の変異株を分離することができた。このようにして精製した DNA 標品は DNase で処理すると直ちに生物活性は喪失され、また無菌試験によつて全く細菌の汚染がないことも確かめられた。ファージ感受性変異株 Transformant R 11 の出現する頻度は培地中に DNA が 20~40 μ g/ml の濃度を含むとき $10^3 \sim 10^4$ 細胞数/ml について約 1 細胞の割合であつたが、自然状態で白色変異株の出現する頻度は $10^8 \sim 10^9$ 細胞数/ml について約 1 細胞の割合であり、これらはいずれもファージ耐性菌であつた。

最近 Catlin はストレプトマイシン耐性菌 *Neisseria meningitidis* によつて培地中に生産された高分子 DNA をストレプトマイシン感受性菌に与えるときは、細胞内から抽出した DNA と同様に型転換をおこして耐性を示す変異株が出現するという報告をしており^{13,14)}、また Hotchkiss と Ottolenghi はストレプトマイシンやスルホンアミドなどの薬品に対する多剤耐性菌 *Pneumococcus R.* の培養濾液中に生産された活性 DNA は、これを野生型菌株に与えることによつてストレプトマイシン耐性を示すようになることを報告している¹⁵⁾、著者の実験によつてもファージ感受性菌 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* とファージ耐性菌 *Bacillus megaterium roseus* との種間の型転換を誘発させる因子は高分子 DNA によるものと判断して間違いないと考えられる。しかし、高分子 DNA とファージ耐性菌との接触がやや長時間にわたるため、その間細胞の選択作用によつて変異株の出現する可能性もあるので、この問題はさらに検討する必要があるものと思われる。

総 括

1) ファージ感受性菌 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus* より抽出、精製した高分子 DNA を紅色のファージ耐性菌 *Bacillus megaterium roseus* に与えることによつて種間の型転換がおこり、種々の変異株を分離することができた。このうち、白色で円滑な集落を形成する変異株 Transformant R 11 はファージ S-a に対して感受性をもつていた。

2) Transformant R 11 はリゾチムに対しても感受性を示し、またアミラーゼ生産能もみられた。菌体の形状は $2.8 \sim 3.8 \times 1.0 \sim 1.3 \mu$ であつて、DNA 供与菌と受容菌との中間の大きさを示していた。

3) Transformant R 11 は DNA 供与菌 *Bacillus*

subtilis var. amyloliquefacus に比較してファージの吸着能は約10%低下していた。また One-step 増殖実験によると両菌株ともファージの潜伏期や平均放出価に変化はなかったが、上昇期は Transformant R 11 においてやや遅れることがわかった。

終りに臨み終始懇切な御指導御鞭撻を賜わった 東京大学理学部の高宮篤教授に対して厚く感謝の意を表する。また種々実験に助力された当教室の都築清氏に対しても厚く感謝する。この報告は Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie (Deutschland) に掲載の予定である。

文 献

- 1) Ephrussi-Taylor, H. : Adv. Virus Research, **3**, 275 (1955)
 - 2) Schaeffer, P. : Symposia Soci. Exptl. Biol., **12**, 60 (1958)
 - 3) Fukuda, S. : J.Gen. Appl. Microbiol., **6**, 90 (1960)
 - 4) Fukuda, S. : ibid, **7**, 1 (1961)
 - 5) Fukuda, S., Tsuzuki, K. : Nature, **190**, 937(1961)
 - 6) Adams, M. H. : Method in Medical Research, **2**, 1 (1950)
 - 7) Hotchkiss, R. D. : Methods in Enzymology (Colowick, S. P., Kaplan, N. O., Eds., Academic Press, New York, **3**, 692 (1957)
 - 8) McCarty, M., Avery, O. T. : J. Exptl. Med., **83**, 89 (1946)
 - 9) Chargaff, E., Zamenhof, S. : J. Biol. Chem., **173**, 327 (1948)
 - 10) Alderton, G. : Biochem. Preparations (Herbert, E. C. Eds., John Wiley, Sons Ins., 1950) **1**, 67
 - 11) Webb, J. M., Levy, H. B. : J. Biol. Chem., **213**, 107 (1955)
 - 12) Weibull, C. : J. Bact., **66**, 688 (1953)
 - 13) Catlin, B.W. : Science, **131**, 608 (1960)
 - 14) Catlin, B.W. : J. Bact., **79**, 579 (1960)
 - 15) Ottolenghi, E., Hotchkiss, R.D. : Science, **132**, 1257 (1960)
-