形質変換による肺炎球菌のストレプトマイシン耐性化

第4報 血清因子を含まない半合成培地での形質変換

小 高 健

東京大学伝染病研究所第3研究部 (部長 武田徳晴教授)

〔受付: 5月7日・1959年〕

肺炎球菌がデスオキシリボ核酸 (DNA) の作用によって形質変換をおこすためには、血清因子の添加が必須である¹⁻³⁾と考えられてきたが、前報^{4,5)}に報告した通り、血清を添加しない培地中でも形質変換が可能である。培地中に存在する非透析性の成分やDNA分割中の高分子不純物が、血清因子の作用を代行する可能性も前報の実験結果から否定できる。しかし、前報に用いた実験方法では、培養開始時にDNAを加えたまま、長時間にわたって培養を続けているので、実際の形質変換が、これとは無関係の population change によって歪められている危険性があった。今度、デスオキシリボ核酸分解酵素 (DNAase) によって、DNAとの反応を短時間で打ちきり、population change が全く関与しない条件で実験してみたところ、やはり同じ結論に達したのでここに報告する。変換すべき形質としては、前報と同じくストレプトマイシン耐性を用いた。

実験材料及び方法

材料の大部分は第3報⁵⁾に記載した通りである。

1. 菌株: R 36 NC
2. 培地: カゼイン水解物を基礎とした半合成培地。(パンクレアチン消化カゼートを用いたのをA培地、酸分解カゼートを用いたのをD培地とよぶ) 前報の実験結果から、透析外液を用いて培地を作っても本質的には結果にかわりがないので、今回は透析操作を行わないカゼートをそのまま使用した。
3. DNA: 精製DNAを M/40, pH 7.4の磷酸緩衝液に 100 γ /ml にとかす。
4. DNAase: Nutritional Biochemicals Corporation 製 (結晶操作1回) を 80 γ /ml に生理食塩水にとかす。
5. 血清: 正常馬血清, 60°C 30分加熱。
6. 実験方法: 血液斜面より接種して 37°C に一夜培

養。翌朝これを2乃至4倍量の培地に接種して混濁が著明になるまで1乃至3時間37°Cに培養する。この準備培養の1容と17容の培地 (但し血清2容を加える時には15容の培地) とを混合し、1.8 ml ずつ小試験管に分注、37°Cの恒温槽中で培養した。培養開始一定時間後に0.2 ml のDNA溶液を加えその後一定の反応時間をおいてからDNAase溶液の1滴を滴下してDNAを破壊した。その後90分培養してから、その0.1 ml を硫酸ジヒドロストレプトマイシン (SM) を150 γ /ml に含んだ血液寒天平板にひろげ、発生する集落を2日間にわたって観察した。ここに生じた耐性集落数は、population change によつては歪められていない真の変換菌数を示している。その理由は、DNA接触後SM耐性が完全に発現するまでに約60分を要し、その後1乃至2時間の間は変換菌の数がかわらないとされているからである⁶⁾。変換系中の総菌数をみる場合には、DNAase添加直後、変換系の一部をとり、これについて菌数計算を行った。

実験結果

1. 増殖曲線からみた血清の影響:

DNAの作用によつて変換がおこるのは logarithmic phase の後半から stationary phase の前半とされている⁷⁾。もしも血清添加によつて菌の増殖が大きく影響をうけるならば、DNAと反応しうる時期も必然的にかわってくるので、まず第一に増殖曲線に及ぼす血清の影響を検討した。混濁が著明に増加している時期の準備培養

ODAKA Takeshi: Acquisition of Streptomycin Resistance by means of Transformation Reaction. IV. Transformation Reaction in Partially Defined Media Containing no Serum Factor. 3rd Division, The Institute for Infectious Diseases, The University of Tokyo. — Jap. J. of Bact., 14(11), 965-968, 1959.

を10倍階段希釈し、これを血清含有、及び血清を含まない培地に $1/20$ 量になる様に加えて 37.0°C に培養、Coleman 比色計で $660\text{ m}\mu$ の Extinction の変化をしらべた。(準備培養をそのまま加えたのが 10^0 , 100 倍及び 1000 倍希釈して加えたのが夫々 10^{-2} , 10^{-4}) なおD培地の場合には $10\text{ }\gamma/\text{ml}$ にDNAが加えてある。第1図はその例であるが、接種菌量が少くなると血清を加えない培

第1図 増殖に及ぼす血清の影響

1) A 培地

2) D 培地

横軸：培養時間、矢印の点(10分前)で準備培養を10倍階段希釈して接種。

地では混濁の増加が時間的におこなれてくる。D培地に 10^{-2} および 10^{-4} を接種したところ、1夜放置後ようやく混濁が認められるようになり、22時間後の Extinction は夫々 0.091 及び 0.016 であつた。一方 10^0 を接種すると、血清の有無にかかわらず同じ様な増殖曲線を示すことが多い。しかし、D培地を使用するとこの接種菌量でも時には大きな差が生ずることもあつた。

この曲線からわかる通り、殊に接種菌量が少い場合には、培養開始後ある特定の時間にDNAを短時間だけ作用させて、血清がある場合とない場合との変換率を比較することは理論的に無意味である。若し比較を行うとするならば、培養の全期間にわたってDNAとの反応性を

しらべなければならない。

実験を短時間で行い、しかも血清の有無にかかわらず似た様な増殖状態をうるためには、 10^0 を接種菌量として用いると良いことが、第1図から結論できる。しかし、第1報⁴⁾の結果からすると、大量の接種菌を用いた場合には血清が加えられてあつても変換が殆んどみられない。このことから、第1報の実験に使用したA培地は、今度の目的にもおそらく不適であろうと考えられる。この点D培地にはかなりの希望が残っていたので、A及びD培地のいずれが今度の実験に適しているかを検討した。

2. 培地の比較：

実験方法の項でのべた方法で実験を行つてみると、第1表の結果がえられた。対照群にはDNAの代りに磷酸

第1表 DNA と反応する時間

1) A 培地

DNA 接 触 時 間*	血清 DNA (-) (-)	血清 DNA (-) (+)	血清 DNA (+) (+)
0.00~1.00	0, 0	0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0
1.00~2.00	0, 0	1, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0
2.00~3.00	0, 0	1, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0
3.00~4.00	0, 0	0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0
4.00~5.00	0, 0	0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0

2) D 培地

DNA 接 触 時 間*	血清 DNA (-) (-)	血清 (-), DNA (+)	血清 DNA (+) (+)
0.00~2.00	0, 0, 0, 0	133, 60, 0, 0	+, +
2.00~3.00	1, 0, 0, 0	++, ++, ++, 1	++, ++
3.00~4.00	0, 0, 0, 0	1, 0, 0, 0	0, 0
4.00~5.00	0, 0, 0, 0	1, 0, 0, 0	0, 0

*：培養開始よりの時間

数字：0.1 ml より生じた耐性集落数

＋：耐性集落は孤立しているが計数不能

++：耐性集落は密生しているが平板全面を覆うほどでない

緩衝液を、DNAase の代りに生理食塩水を加えた。予期した通り、D培地では血清を加えなくとも多数の変換菌がえられるが、A培地では血清を10%に加えても変換菌がえられなかつた。したがつて、以下の実験にはD培地を用いた。

3. Competent cells の時間的消長：

DNA と反応して形質変換をおこしうる菌は、一般に competent cell と呼ばれている。この様な細胞は培養の全期間にわたって存在するのではなく、logarithmic ph-

ase の後半にあらわれて、その後しばらく存在し、次第に消失してしまうとされている。この様な見地から、血清のはいっていない D 培地中の competent cells の消長をみると、第 2 表の通りで、今までの説に一致している。

第 2 表 DNA と反応する時間

DNA 接触時間	血清 (-)		DNA (+)	
0.00~0.30	0,	0,	0,	0
0.30~1.00	0,	0,	0,	0
1.00~1.30	0,	0,	0,	0
1.30~2.00	0,	0,	0,	0
2.00~2.30	18,	0,	0,	0
2.30~3.00	++,	++,	++,	25
3.00~3.30	++,	++,	+,	204
3.30~4.00	+,	129,	13,	0
4.00~4.30	0,	0,	0,	0
4.30~5.00	0,	0,	0,	0

0.1 ml より生じた耐性集落数

第 2 表は 1 群 4 本の反応系について変換をみているのであるが、4 本は全く同じ条件でありながら、かなり異った数の変換菌を含んでいる。この 4 本をひとまとめにして、総菌数に対する変換菌の数を示したのが第 2 図で、培養全体としては、増殖が殆んど頭うちになった様な時

第 2 図 Competent cells の変動

期に competent cells が出現することが示されている。この実験では、培養開始後 3 時間より 3 時間半までの間に competent cells の数は最高値に達し、この時の変換率はほぼ 0.05% と推定される。

4. 血清の影響:

血清を含まない半合成培地での competent cells の消長は、第 2 図の通りであるが、血清が添加されていると

きに、この曲線がどの様に変化するかを次に検討した。準備培養を血清を含まない培地でつくり、これを血清を含まない培地及び血清を含んだ培地に同時に接種して、30 分ごとの反応性をしらべた。前実験から、同一条件の変換系の間にもかなりのばらつきがあることがわかったので、この実験では 3 本の試験管を 1 群とし、総菌数をしらべるには DNAase 添加後直ちに各試験管より一定量ずつ集めて混合し、これについて菌数計算を行った。耐性化した菌数をみるには、DNAase 添加 90 分後に、3 本の変換系を混合し、この一定量を SM 平板にひろげて培養した。第 3 図はその 1 例である。図にみる様に、2

第 3 図 血清の影響

時半後の総菌数は、血清含有培地でやや多い。一方 competent cells は、血清含有培地で約 1 時間はよく現われ、その数も多く、存在期間も長くなっている。

考 按

肺炎球菌の形質変換に用いる培地については、特に血清学的性状の変換の場合に色々と工夫がこらされている^{7,8)}。ここに使用した Adams and Roe の培地⁹⁾については、Hotchkiss が唯一行、この培地も使用しようと書いている¹⁰⁾だけで、この培地を用いた形質変換の報告はみあたらない。この培地の利点は、半合成培地ということから明らかな通り、制御できない未知物質を含むことが少ないという点であるが、原法通り酸分解カゼートを使用した場合 (D 培地) には、時に発育が著しくおくれ、実験に支障をきたすことがあつた。しかし、この培地は血清因子を加えずに大量の接種菌量で実験するには適していると思う。

接種菌量が少くなると、菌の増殖がおくれるのは、培地中に混入する金属の阻害ではないかと考える。Stephenson によると、この様な阻害は合成培地で著明で、大量の菌を接種する際には古い培地から入ってくるコロイド状物質がこの阻害作用を中和するという¹¹⁾。したがって、血清にもこの阻害除去作用があるだろうとは容易に推測される。

パンクレアチン消化カゼートから作った Adams and Roe の培地 (A 培地) では、同じ方法で変換がおこらなかった。しかし、この培地でも接種菌量を適当に加減すれば、おそらく変換が可能だと考えられる。文献的にみると、本実験のように大量を接種している例¹²⁾は少く、 10^4 乃至 10^4 位の菌を用いていることが多い。接種菌量が多いか、又培地があまり適していないか又は培地が稀釈されている場合には、competent cells の出現曲線はせまい鋭い峰になるとされている¹³⁾ので、本実験のように DNA と反応可能の時間が短いのは、接種菌量が多い点から説明できる。唯、本実験の場合には、血清を加えた例でも変換率が 0.03 乃至 0.003% 程度で、文献的に 0.2 乃至 5% が可能といわれる¹⁴⁾ことからみると、この変換率ははるかに悪い。第 2 図に血清を加えないで 0.05% の変換が起つた例が示されているが、この時には血清を加えた変換実験を行わなかった。この図の成績は最も良い例で、血清を加えないでいつもこの様な大きな峰がえられるとはかぎらず、もつと低い鋭い峰のこともあり、6 回の実験のうち 1 回だけは全然変換菌がえられなかった。血清を加えた例ではこの様な陰性例はみられなかった。頻度ということを問題にする場合には、一定の時間内で良好な発育が可能な限りで、少い接種菌量を用いればよいのではないかと考える。又全血清は変換に不適で¹⁵⁾殊にグロブリン分画には抑制作用があるとさえいわれているので²⁾、アルブミン分画だけを使用するのも頻度を高める目的には良いと思う。

血清を加えると competent cells の出現が約 1 時間位はやまることは、4 回繰返したすべての実験にみられ、又変換率が高いことも 3 回の定量的実験のすべてにみられているので、この 2 つの現象は単なる偶然ではないと考えられる。しかし 2 時間半後の総菌数が血清含有培地で多少とも多いので、competent cells の出現が早くなることが、変換に及ぼす血清の本質的影響なのか、或は、菌の増殖促進ということを介しての 2 次的影響なのか、まだ確定的なことのいえる段階に達していない。若しこれが本質的な作用だとすると、血清は菌が competent に

なるために何か補助的な物質を供給するのか、又は培地中に存在する阻止因子を中和するのかも知れない。

今まで肺炎球菌の形質変換がおこるためには、適当な菌株、DNA、血清因子及び発育に適した培地が必要であるといわれてきた。しかし本実験にみるように、血清因子は必須ではなく、又半合成培地が便利ながわかつたので、今後この現象を生化学的に解析するにあたって、考慮すべき因子の数が少くなったといえよう。

結 論

血清因子を含んでいない Adams and Roe の半合成培地中で、肺炎球菌の 1 菌株 (R36NC, II R) はストレプトマイシン耐性の形質変換が可能である。しかし血清を添加すると、competent cells の出現が 1 時間位早まり、頻度も高く、又 competent の状態もながく続く。

本研究の要旨は、昭和 34 年 4 月 23 日、伝研予研学術集談会において発表した。

文 献

- 1) McCarty, M., Taylor, H. E. & Avery, O. T. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 11, 177, 1946.
- 2) Hotchkiss, R. D. & Ephrussi-Taylor, H. : Fed. Proc., 10, 200, 1951.
- 3) Fox, M. S. & Hotchkiss, R. D. : Nature, 179, 1322, 1957.
- 4) 小高健: 日細, 1959(4), 予定
- 5) 小高健: 日細, 1959(10), 予定
- 6) Hotchkiss, R. D. : Dynamics of Virus and Rickettsial Infection, Blakiston, New York, 405, 1954.
- 7) Avery, O. T., MacLeod, C. M. & McCarty, M. : J. Exp. Med., 79, 137, 1944.
- 8) Ephrussi-Taylor, H. : Exp. Cell Research, 2, 589, 1951.
- 9) Adams, M. H. & Roe, A. S. : J. Bact., 49, 401, 1945.
- 10) Hotchkiss, R. D. : Methods in Enzymology, vol. 3, Academic Press, New York, 712, 1957.
- 11) Stephenson, M. : Bacterial Metabolism, Longmans, New York, 166, 1949.
- 12) Thomas, R. : Biochim. Biophys. Acta, 18, 467, 1955.
- 13) Hotchkiss, R. D. : The Chemical Basis of Heredity, Johns Hopkins Press, Baltimore, 321, 1957.
- 14) Hotchkiss, R. D. : Proc. Natl. Acad. Sci., 40, 49, 1955.