OP₁ phage(*Xanthomonas oryzae* bacteriophage)

の増殖に関する研究*

II. OP_{1t} phage (OP₁ phage の発育適温変異株) の OP₁ phage 増殖への干渉

脇 本 哲**

SATOSHI WAKIMOTO: STUDIES ON THE MULTIPLICATION OF OP₁ PHAGE
(*XANTHOMONAS ORYZAE* BACTERIOPHAGE).(GROWTH TEMPERATURE MUTANT STRAIN OF OP_{1t} PHAGE)
TO OP₁ PHAGE MULTIPLICATION.

〔受稿 5月30日 1956〕

緒 言

Bacteriophage の増殖は bacteria に吸着した phage がその内容 (desoxiribonucleic acid) を菌体内に注入することに始まる。侵入した DNA は所謂 genetic marker として菌体内で親と全く同一の子 phage を複製する主導的役割を演ずる。こゝに 1 細菌細胞が存在し、これに共に親和性のある virulent な 2 種類の phage を加える時、両者の bacteria に対する反応の相互間に所謂干渉現象が見られる。そもそも bacteriophage の系統分類の基準は血清学的反応と形態学的類似性によつており、同一の bacteria を犯す bacteriophage にも、この基準に従つて同一の範ちうに属するもの即ち related phage と然らざるもの即ち unrelated phage とが存在する。干渉現象はこの基準に従つた両者により、その現われ方を異にする。

即ち unrelated phage の場合は Delbrück^{5,6)} の E. coli phage α (T1), δ (T7), γ (T2) に於ける実験に見られるように相互排斥 (mutuale exclusion), 抑圧効果 (depressor effect) が現れる。即ち同時感染の場合に bacteria に吸着した 2 種類の phage の内一方の phage 内容のみが菌体内に侵入し自己再生産を行い、他方は排斥され侵入増殖が起らない。菌体外に止まつた他種類の phage は侵入した phage の

増殖に干渉し、これを抑圧するというのである。

これに対し related phage に於ては同時感染の場合は同一細胞に両者侵入し、両方共に増殖し得、更に新生されて放出される phage には夫々両親の形質を持つもの、外に両親の形質を兼ね備えた recombinant が得られる。即ち菌体内で両親の形質の recombination が行われる結果である。感染に時間的ズレのある場合には先に侵入した phage の特性によつて、次に感染した phage の増殖に干渉が現われる時間的限界が略一定している。この related phage 間の干渉現象は Dulbecco^{3,7)} の実験に於て極めて詳細である。

筆者は稲の白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae*) の phage として従来保存している OP₁ phage から唯発育適温のみを異にする新系統の phage (mutant) を得た。これを OP_{1t} phage と名付けた。

Bacteriophage の mutant の種類には wild type の phage より寄主範囲の異つた host range mutant,^{7,13)} bacteria の indicator strain 上に於て plaque の形状の異なる plaque morphology mutant,^{7,12)} その他 adsorption cofactor mutant,³⁾ proflavine-resistant mutant 及び heat-resistant mutant²⁾ などが発見されている。筆者の発見した OP_{1t} phage はこれらの何れにも属さない新しい変異形質を持った株であり、これを growth temperature mutant と呼ぶこととした。

* 九州大学農学部植物病理学教室業績

本実験は九州大学農学部吉井甫教授の御指導の下に行つたものである。深謝の意を表する。

** 九州大学農学部植物病理学教室

筆者はこゝにこの OP₁ phage が OP_{1t} phage 増殖に如何なる干渉現象を示すかを単細胞実験¹⁰⁾ (Single burst experiment) と一段増殖実験¹⁰⁾ (One step growth experiment) により追求した。

材 料

OP₁ phage: 従来筆者の保存している, *Xanthomonas oryzae* に特異的な bacteriophage であり, その性質の若干については既に報告した¹⁵⁾。

OP_{1t} phage: OP₁ phage から growth temperature mutant として得られ strain であり, 血清学的に OP₁ と全く差異は見られず, その他の諸性質も OP₁ phage と殆んど変化ないが, 唯発育適温のみを異にする。

Xanthomonas oryzae no. 60: *X. oryzae* no. 49 から単個分離して得た新しい系統である。

Ca V_f Ch 培養基: Ca Cl₂ 加用無ビタミンカゼイン加水分解物培養基¹⁵⁾

OP₁ phage 抗血清: 前報¹⁷⁾と同様な方法により得たものであり, これは OP₁ phage に作用し, これを不活性化する能力を有するのは勿論であるが, OP_{1t} phage にも同能力で作用し不活性化する。

方 法

Single-burst experiment は bacteriophage に感染された単一の bacteria から放出される bacteriophage の数を別々に定量するに用いる方法である。或2種類の bacteriophage が単一細菌細胞に同時に, 或は或る時間的間隔を持つて感染した場合, 同一細胞内での干渉現象を明らかにするには, この方法によらねばならない。この方法は, 要するに1本の試験管に, bacteriophage に感染された bacteria が平均1細胞以下の割合に含まれる如く配分し, 一定条件でburstさせた後 plaque count method で新生された bacteriophage を定量し, 個々の bacteria から放出される bacteriophage の粒子数を個々別々に明らかにするのを目的とする。こゝに用いた single-burst experiment の手順は Protocol 1 及び 2 の如くである。

OP₁ phage, OP_{1t} phage それぞれ単独の場合の one step growth experiment は Protocol 3 に従つた。

OP₁ phage と OP_{1t} phage の plaque による鑑別法

OP₁ phage は *X. oryzae* no. 49 上に於て, 25°C, 30°C 共に明瞭な plaque を形成する (Fig. 1, Fig. 3)。これは, この温度下に於て OP₁ phage に感染された *X. oryzae* no. 49 の細胞は完全に lysis を起す為である。然るに, この OP₁ phage から得られた mutant OP_{1t} phage は 25°C に於ては OP₁ phage と区別出来ない明瞭な plaque を形成するが, 30°C に置けば極めて不明瞭で殆んど判別不可能である。即ち両 phage は何等かの原因でかゝる高温下では bacteria の lysis を起す能力を抑圧されるものと考えられる。この差異を利用し, OP₁ phage と OP_{1t} phage の混合した浮游液を plaque count method の常法により plating した後, 25°C 15時間, 30°C 3時間, 再び 25°C 数時間という過程を踏ませれば OP₁ phage による plaque は 30°C での影響が plaque の形に現われなないのに対し, OP_{1t} phage による plaque に於ては 30°C で感染した部分の bacteria は lysis を起さず明瞭な ring を形成する。この ring の有無により両 phage の区別は容易に可能である (Fig. 3, Fig. 4)。OP₁ phage も 25°C, 35°C, 25°C の変温の過程を踏ませれば OP_{1t} phage の 25°C, 30°C, 25°C の場合と全く同様な ring を有する plaque を形成する。両 phage 間には唯発育適温に差異があるのみであるから当然のことではある。OP_{1t} phage は plating 後 30°C に一定時間置いた後に 25°C の適温に戻せば Fig. 4 中に見られるような lysogenic strain を思わせる plaque を形成する。この場合の plaque forming efficiency は plating 後直ちに 25°C に置いた場合の10分の1程度である。

実 験 結 果

Protocol 1 から得られた結果は Result 1 に示す。Protocol 2 から得られた結果を Result 2 に示す。

Protocol 3 から得られた OP₁ phage, OP_{1t} phage の *X. oryzae* no. 60 での増殖の模様は Result 3 の如くである。

検 討

既に緒言に述べたように2種類の phage 間の増殖の場に於ける干渉は related phage と unrelated phage に於てその様相を異にする。血清学的, 形態学的に同一部類に入る所謂 related phage に於ては同一寄主に同時感染した場合, 同時に侵入し, 共に増

Protocol 1. Protocol of single burst experiment (1).

	Temp (°C)	Time
1. Adsorption tube:-----		
OP phage suspension (2.0 × 10 ⁸ /ml.)		
OP phage suspension (3.3 × 10 ⁷ /ml.)		
Bacterial suspension (5.0 × 10 ⁵ /ml.)		
2. Serum tube: anti-phage serum	30	5 min.
3. Dilution tube 1: CaVfCh media	30	5 min.
4. Dilution tube 2: CaVfCh media	25	30 min.
5. Growing tube 1: CaVfCh media	25	30~60 min.
6. Growing tube 2: 50 tubes	25	15 hrs.
7. Plating for plaque making	25	3 hrs.
8. Change of incubation temperature	25	5 hrs.
9. Plaque counting		

Protocol 2. Protocol of single burst experiment (2).

	Temp (°C)	Time
1. Adsorption tube:-----		
OP _i phage suspension (2.0 × 10 ⁸ /ml.)		
OP _{it} phage suspension (3.3 × 10 ⁷ /ml.)		
Bacterial suspension		
2. Serum tube: anti-phage serum	30	5 min.
3. Dilution tube 1: CaVfCh media	30	5 min.
4. Dilution tube 2: CaVfCh media	25	35 min.
5. Growing tube 1: CaVfCh media	25	35~60 min.
6. Growing tube 2: 50 tubes	25	15 hrs.
7. Plating for plaque making	25	3 hrs.
8. Change of incubation temperature	25	5 hrs.
9. Plaque counting		

Protocol 3. Protocol of one step growth experiment.

	Temp (°C)	Time (min)
1. Adsorption tube:-----		
OP _i phage (or OP _{it} phage) suspension (9.2 × 10 ⁸ /ml.)	30	5
Bacterial suspension	30	5
2. Serum tube: anti-phage serum	30	5
3. Dilution tube: CaVfCh media	25	5
4. Growing tube: CaVfCh media		
5. Plaque counting (plating at 5 min. interval)		

殖し、或割合で recombination の起るのが普通である。

こゝに用いた OP_{it} phage は OP_i phage からの mutant であり、唯増殖適温が異なるのみで血清学的その他あらゆる性質は類似している所謂 related phage である。従つて常識に従えば、この両者は同一細菌細胞内に同時侵入し、両者同時に増殖可能な筈である。Protocol 1 はこの現象確認と、同一細胞内に於て両種の phage が増殖可能な場合の phage の生産能力の変化の有無を検する為に行つた single burst experiment であり、Protocol 2 は両感染 phage 数の比の変化により、細胞の phage 生産能力分配に差が生ずるか否かを検する目的で行つたものである。

Result 1 の 50 本の試験管に於ける感染細菌の分配模様をポアソン公式

$$P(r) = \frac{n^r \cdot e^{-n}}{r!}$$

P(r): 感染細菌 r 個含まれる試験管の割合

n: 試験管 1 本に含まれる平均感染細菌数

により検討すれば Result 1' のようである。

即ち OP_i phage を生産した 26 本の試験管の内 18 本は唯 1 個の OP_i phage 感染細胞が含まれていたと考えられ、7 本は 2 個の感染細胞、2 本は 3 個の感染細胞が含まれていたと考えられるから、OP_i phage 感染細菌総数は 36 個と計算される。故に 26 本の生産した OP_i phage の総数 326 を 36 で除すればこの実験に於ける OP_i phage の average burst size が得られる。故に OP_i phage のこの時の average burst size N_{opi} は

$$N_{opi} = \frac{326}{36} = 9.1$$

OP_{it} phage については、OP_i phage も共に生産した細菌に注目すれば、この 26 本中に生産された OP_{it} phage の総数は 489 と計算され、これを OP_i phage の場合と同様に 36 で除すれば、この場合の OP_{it} phage の average burst size N_{opit} が得られる。

即ち、

$$N_{opit} = \frac{489}{36} = 13.6$$

又 OP_i, OP_{it} 両 phage を生産した 26 本の試験管即ち 36 個の感染細菌細胞について総合して考察すれば 36 個の細胞で total 815 の phage を生産したことになるから total average burst size N は

$$N = \frac{815}{36} = 9.1 + 13.6 = 22.6$$

となる。

この数値は別の実験、即ち、Protocol 3 から得られている夫々単独に感染した場合の average burst size 約 25 と大差はない。換言すれば混合感染の場合も、単独感染の場合も細菌の phage 生産能力には殆んど変化は認められず、略一定数の phage を生産する。

Result 1. Result of single burst experiment (1).

Tube no.	No. of plaques		Tube no.	No. of plaques		Tube no.	No. of plaques	
	OP ₁	OP _{1t}		OP ₁	OP _{1t}		OP ₁	OP _{1t}
1	0	0	18	0	0	35	0	43
2	15	9	19	17	16	36	10	15
3	20	14	20	0	2	37	17	2
4	6	9	21	0	20	38	0	16
5	13	19	22	0	5	39	43	23
6	0	22	23	7	3	40	1	20
7	2	32	24	0	0	41	7	23
8	4	24	25	14	17	42	1	28
9	2	34	26	6	7	43	9	37
10	3	27	27	0	40	44	11	13
11	7	26	28	0	31	45	0	32
12	0	39	29	0	35	46	0	53
13	0	1	30	19	13	47	6	23
14	0	0	31	0	44	48	47	26
15	26	26	32	0	27	49	0	39
16	0	2	33	0	43	50	0	4
17	13	3	34	0	0			

Check (no. of free phages) per 0.1 ml. of dilution tube 2.

$$\frac{OP_1 \cdot 2}{OP_{1t} \cdot 6}$$

Total tubes	Tubes contained bacteria infected with OP ₁	Nos. of free phages in 26 tubes		
		OP ₁	OP _{1t}	Total
50	26	326	489	815

Result 2. Result of single burst experiment (2).

Tube no.	No. of plaques		Tube no.	No. of plaques		Tube no.	No. of plaques	
	OP ₁	OP _{1t}		OP ₁	OP _{1t}		OP ₁	OP _{1t}
1	0	57	18	0	92	35	0	140
2	0	85	19	0	120	36	37	112
3	3	59	20	0	58	37	28	90
4	0	118	21	0	110	38	0	95
5	0	70	22	15	140	39	1	140
6	0	81	23	15	96	40	0	150
7	0	81	24	7	82	41	0	95
8	0	88	25	25	45	42	14	65
9	0	112	26	0	79	43	0	120
10	7	120	27	0	112	44	16	70
11	1	95	28	13	160	45	0	120
12	22	54	29	29	102	46	0	70
13	0	90	30	0	67	47	0	70
14	0	56	31	4	69	48	15	200
15	0	90	32	0	100	49	1	170
16	21	75	33	0	100	50	0	190
17	0	96	34	7	120			

Check (no. of free phages) per 0.1 ml. of dilution tube 2.

$$\frac{OP_1 \cdot 1}{OP_{1t} \cdot 2}$$

Total tubes	Tubes contained bacteria infected with OP ₁	Nos. of phages in 20 tubes		
		OP ₁	OP _{1t}	Total
50	20	281	2064	2345

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 1. Plaques formed by OP_1 phages, incubated for 15 hrs. at $30^\circ C$.

Fig. 2. Plaques formed by OP_{1t} phages, incubated for 15 hrs. at $25^\circ C$., 3 hrs. at $30^\circ C$. and 3 hrs. at $25^\circ C$. successively.

Fig. 3. Plaques formed by OP_1 mixed with OP_{1t} phages, incubated for 15 hrs. at $25^\circ C$., 3 hrs. at $30^\circ C$. and 3 hrs. at $25^\circ C$. successively. Three phages with rings on the upper right side are formed by OP_{1t} . While the others are formed by OP_1 .

Fig. 4. Plaques formed by OP_1 and OP_{1t} phages, incubated 10 hrs. at $30^\circ C$. and 5 hrs. at $25^\circ C$. successively.

Result 3. Result of one step growth experiment.

	Latent period	Rise period	Average burst size
OP _I	45 min.	20 min.	25 (22-28)
OP _{It}	40 min.	20 min.	25 (22-28)

Result 1'. Result of single burst experiment.

	試 験 管 数 (50×P)	OP _I phage 感染細菌数 (r×試験管数)
P (0) = 0.48 = e ⁻ⁿ = e ^{-0.74}	24	0
P (1) = 0.353	18	18
P (2) = 0.131	7	13
P (3) = 0.032	2	5
P (4) = 0.006	0	0
	計	36

Protocol 2はOP_I phage に対するOP_{It} phage の割合を増加して感染させた場合の実験であるが、Result 2からOP_I phage の average burst size を計算すれば約9となり、Result 1の場合と略同一の結果が得られる。即ち両 phage 生産能力の分配は感染する phage の数の差によらず殆んど変化しないものと考えられる。

結局 Result 1, 2を Result 3から考察するに、OP_I phage 及びOP_{It} phage による混合感染の場合、細菌の phage 生産能力を分配して両 phage の生産数に差が生じているのは Result 3に示す latent period の大小にその原因を求めるのが適当であらう。

要 約

OP_I phage から一段の mutant として得られたOP_{It} phage は増殖適温のみを異にする新しい型の mutant であり、growth temperature mutant と名付けた。このOP_{It} phage は同一細菌細胞にOP_I phage と同時に感染した場合、同時に侵入し共に増殖し得る。この場合細菌の phage 生産能力は感染した細菌の数比によらず両者の特性、恐らく細菌内に於

ける再生産の遅速により分配され、それに応じて両者の子孫をそれぞれ放出するが、total の phage 生産数はそれぞれ単独感染の場合と変化ない。

参 考 文 献

- 1) Adams, M. H. Method in Medical Research, 2, 1-73, 1950.
- 2) Adams, M. H. and Lark, G. Jour. Immunol., 64, 335-347, 1950.
- 3) Anderson, T. F. Jour. Bact., 55, 651-658, 1948.
- 4) Burnet, F. M. Br. Jour. Exp. Path., 10, 109-115, 1929.
- 5) Delbrück, M. and Luria, S. E. Arch. Biochem., 1, 111-141, 1942.
- 6) Delbrück, M. Jour. Bact., 50, 151-170, 1945.
- 7) Doermann, A. H. and Hill, M. B., Genetics, 38, 79-90, 1953.
- 8) Dulbecco, R. Genetics, 34, 126-132, 1949.
- 9) Dulbecco, R. Jour. Bact., 63, 209, 1952.
- 10) Ellis, E. L. and Delbrück, M. Jour. Gen. Physiol., 22, 365-384, 1939.
- 11) Foster, R. A. C. Jour. Bact., 56, 795-899, 1948.
- 12) Hershey, A. D. Genetics, 31, 620-640, 1946.
- 13) Luria, S. E. Genetics, 30, 84-99, 1945.
- 14) 松井千秋 九大・農・学芸雑誌, 14, 51-56, 1953.
- 15) 脇本哲 九大・農・学芸雑誌, 15, 151-160, 1955.
- 16) Weigle, J. J. and Delbrück, M. Jour. Bact., 62, 301-318, 1951.