ファージ増殖に対する紫外線の影響

第1報 紫外線照射大腸菌のファージ産生について*

中 村 正 好**

MASAYOSHI NAKAMURA: EFFECT OF ULTRAVIOLET LIGHT
ON THE MULTIPLICATION OF BACTERIOPHAGE(1) STUDIES ON THE BACTERIOPHAGE REPRODUCTION OF ULTRAVIOLET
LIGHT IRRADIATED E. COLI INFECTED WITH T₂

〔受稿 11月14日 1960〕

大腸菌は紫外線^{1,2)}, X線³⁾, その他の放射線, マスタードガス⁴⁾, 過酸化水素水⁵⁾, マイトマイシンC⁶⁾などによつて容易に不活性化されるが, この様にして不活性化された菌にT系偶数番バクテリオファージを感染させると, ファージを産生することが知られている。但しマイトマイシンCが高濃度であるときに産生されるファージは, 自己増殖活性を持たないと云うことが報告されている⁶⁾。過酸化水素処理を充分行くと, コロニー形成能は失なわれプラーク形成能は残るが, この際 latent period が長くなり, burst size が少なくなることが見出された⁵⁾。又紫外線照射の障害の甚だしい菌で, burst size が減少することも知られている^{1,2)}。この原因を明らかにすることが出来れば, ファージ増殖の機構や生物に対する放射線障害の機構を解明するための重要な手掛りが得られるものと考えられるので, 色々な角度から研究を行つた。第一報では紫外線照射菌のファージ増殖の一般的な様相について研究した結果を報告する。

材料及び方法

1. 宿主菌株: E. coli B(H) (Hershey 株)
2. ファージ: T₂r⁺
3. 培地: Hershey⁷⁾ の用いたものを少し変更したトリスグルコース培地 (TG培地) と, ペプトングルコース培地 (PG培地) を用いた。その組成はそれぞれ次の通りである。

TG 培地 (1 立当りの含量)

NaCl	5.4g
KCl	3.0g
NH ₄ Cl	1.1g
CaCl ₂	0.1mM
MgCl ₂	1.0mM
Tris-HCl バッファー	0.1M
P (KH ₂ PO ₄ として)	20mg
S (Na ₂ SO ₄ として)	6 mg

pH 7.2

グルコース 2 g

トリス培地

上記トリス培地にグルコースを加えたものがTG培地であり, グルコースは菌の培養に当つて加える様にした。

PG 培地 (1 立当り含量)

ポリペプトン	20g
NaCl	5 g
グルコース	2 g

pH 7.2

4. T₂r⁺抗血清: 調製法, 使用法とも大体 Adams⁸⁾に従つた。

5. 紫外線照射: 照射光源としては, マツダ15ワット殺菌灯を使用した。試料に対する照射の条件を一定にするために, 0℃付近で照射する様にしたが, そのために二重底のシャーレを用い, 二つの底の間に砕氷を詰めた。又試料の液層が大体1mmになる様に, 液量

* 本報の要旨は第6回ウイルス学会総会 (1959, 東京) で発表した。

** 京都大学ウイルス研究所化学部

に応じて適当な大きさのシャーレー用いた。

その他の実験方法は、結果を報告する際に必要に応じて述べることにする。

実験結果と考察

1) コロニー形成能及びプラーク形成能に対する紫外線の影響

TG 培地で約 $3 \times 10^8/\text{ml}$ に培養した大腸菌を、トリス培地で遠心によつて1回洗滌し、この培地で再溶する。この菌液に色々な dose の紫外線を照射し、コロニー形成を有する菌の数を測定する。ついで各試料に感染の多重度が5になる様に T_2 ファージを感染させ、ファージ添加後、 37°C 10分後にグルコースを加えファージ増殖反応を開始させる。反応開始後5分と25分に各試料を取出し、5分間の血清処理で遊離のファージを除き、反応開始後10分及び30分でのプラークを作り得る感染菌の数を測定する。光源から30cmの距離で紫外線照射を行つたときの結果を第1図に示す。これから明らかな様に、コロニー形成能は紫外線照射によつて極めて容易に失われるが、プラーク形成能はあまり減少しない。第1図曲線(A)は反応開始後10分、(B)は30分でのプラーク形成能を示す。これはTG培地培養菌について見られる特異現象であり、one step growth curve にも関係するのであつて検討することにする。

第2報以降に報告する菌体内合成の状況の検討のために用いた照射条件は、光源からの距離30cm、照射時間5分と云う強烈なものである。この様な照射を行うと、コロニーを作り得る菌体は殆どなく、第2図に示す様に照射後菌体を新しい培地に移して、60分間の培養を行つても濁度の増加は全く見られない。一方未照射菌は同じ条件の培養で可成りの濁度の増加を示し、生菌数は2倍以上に増加する。尚弱い照射を受けた菌を培養すると、菌体の細胞分裂が停止してヒラメント状に成長し、可成の濁度増加を示す。次に上の様に強い紫外線照射を受けた菌の核酸と蛋白質の合成状況を、 P^{32} と S^{35} をトレーサーとして検討した結果、何れの合成量も極めて少量であることが明らかとなつた⁹⁾。第1図で明らかな様に、強烈な紫外線照射を受けた菌は、相変わらず T_2 を作り得る能力を残している。この様な菌を用いれば、菌自体では核酸及び蛋白質の合成はないが、ファージ感染後はファージ合成を起し得ると云う便利な系の研究が可能となるものと思われる。従つて実験の焦点をこの様な菌に絞る、色々な角

度から検討することにした。尚この様なファージ合成能を有する菌では、酸素消費が殆ど阻害されていないが、より強烈な照射を行なうことによつて、はじめて菌の酸素消費を完全に抑制出来るが、この様な菌はもはやファージ産生も行なわないと云う事実が、以前に渡辺、佐々木によつて見出されている¹⁰⁾。

2) burst size 及び latent period に及ぼす紫外線 dose の影響

Fig. 1 Effect of UV-light on the colony and plaque forming ability of *E. coli*.

UV dose (15 watt, 30 cm, min.)

Fig. 2 Growth of Normal and UV (15 watt, 30 cm, 5 min.) irradiated *E. coli*

Fig. 3 One step growth curve of normal and UV-irradiated *E. coli* (single infection of T_2 in PG medium)

Fig. 4 One step growth curve of normal and UV-irradiated *E. coli* (single infection of T_2 in TG medium)

UV dose (15 watt, 30cm) on *E. coli*

Fig. 5 Latent period and burst size of T_2 multiplication in *E. coli* irradiated with various dose of UV-light (in PG medium).

UV dose (15 watt, 30 cm) on *E. coli*

Fig. 6 Latent period and burst size of T_2 multiplication in *E. coli* irradiated with various dose of UV-light (in TG medium).

Table 1. Burst Size and Latent (Eclipse) Period of T_2 Infected Un-or UV-Irradiated *E. coli*

Multiplicity of Infection	Medium	Time of Irradiation (min.)	Burst Size	Latent Period (min.)	Eclipse period (min.)
$\frac{1}{10} \sim \frac{1}{20}$	PG	0	130	25	—
		7	50	34	—
	TG	0	65	25	—
		5	12	55	—
5	TG	0	70	(25)	13
		5	20	(50)	35

one step growth の実験を Adams⁸⁾に従って行つた。多重度を $1/20 \sim 1/10$ で感染させた場合の、所謂単一感染の one step growth curve を第3図 (PG 培地) と第4図 (TG 培地) に示す。この curve から得た代表的な値を第1表に示す。この図から紫外線の dose の増加に伴い、latent period が長くなり、burst size が減少して行くことが明らかである。これを図示すると第5図 (PG 培地) 及び第6図 (TG 培地) の様になる。何れの培地でも、latent period の増大と burst size の減少は、紫外線の dose に対して連続的に変化する。又PG培地培養菌からの方が、高い burst size でファージが得られるが、紫外線の dose による burst size の減少率は両者とも大体同様である。即ち何れの培地で培養した菌でも、紫外線照射に対して同様な影響を受けることを示す。

PG 培地を用いて培養した菌の方が高い burst size でファージを産生するが、この場合菌体の大きさは、PG 培地培養菌の方が TG 培地培養した菌に比して形が大きい。これは顕微鏡的にも、菌数に対する比濁度の値からも観察出来る。TG 培地にカザミノ酸を補うと、PG 培地と殆ど同様な burst size (130位) でファージを産生する菌が得られるが、その菌の大きさも PG 培地培養のものと同じ位である。又軽度の紫外線照射によつてヒラメント状に成長した大腸菌の burst size が、菌体の大きさによつて若干増加して行くこと云う報告もあり、菌体の大きさと burst size の間に何か関係があるらしい。この様に TG 培地は菌の成長のためには最良のものではないが、培地の成分が明確であるため、以後のトレーサー実験を主とするこの研究には主にTG培地を用いることにした。尚Anderson は紫外線照射菌に対する T_2 ファージの吸着能が減少していることを報告しているが¹⁾、我々の実験では照射菌に対するファージの吸着が予想外によく、未照射菌に対する吸着と大差ないことが判つた。

次に前に述べた第1図曲線(A)と曲線(B)の差、及び第4図で(A)の様な増加を示す部分が出現する理由について考えることにする。これは照射菌にファージを感染させて液体培地中で培養していると、ブランクを作り得る感染菌の数が増加して行き〔第4図(A)〕、或る時間後一定値〔第4図(B)〕に到達する現象であつて、これはTG培地培養菌にのみ見られるものである*。即ちTG培地培養紫外照射菌はファージ感染(吸着)後、

不完全感染とでも云うべき段階を経て感染が完了するもの、様である。この(A部分)に相当する感染菌体は、液体培地中で培養では感染反応が進行するが、之を寒天平板上に移してしまふとそれ以上の反応が停止してしまふらしく考えられる。このためTG培地培養菌の burst size の決定には、感染菌数をして一定値(B)を採つて計算した。またこの現象が何故起るのか不明であるが、これに關して行つた実験について述べることにする。a) 照射菌に T_2 ファージを感染させ、抗 T_2 血清中に感染液を移しそのまゝ反応させた場合と、これを稀釈して血清の効果を除いた場合の感染菌数の測定を行つた結果を、第7図に示す。この様に放出される遊離のファージを不活性化させつゝ行つた実験でも尚(A部分)が見られることから、この(A部の増加が遊離のファージの放出によつて起るものでないこと、即ち感染が完了した菌体が増加することを示す様に思われる。又この血清中での実験から、ファージ DNA の注入は正常に行なわれているものと思われるが、或はファージが不可逆的な吸着の段階に止まつて、注入の過程に手間どつているのかも知れない。b) この実験では感染菌数を二重寒天法で測定した⁸⁾ので、軟寒天を固定させるため一時的に室温に放置するが、この際の温度降下のために(A区間の反応が停止してしまう可能性が考えられる。それで感染菌液を20分間0°C近くに下げ、再び37°Cで培養したが、この場合も感染菌数

Fig. 7 Multiplication of T_2 phage in UV-ed *E. coli* in the presence or absence of anti- T_2 -serum

* この現象はTG培地培養紫外線照射菌にファージを感染させ、PG培地で培養した時にも見られるので、菌自体の性質によるものと考えられる。

Fig. 8 Turbidity measurement of normal and UV-ed *E. coli* after T_2 infection.

Fig. 9 One step growth curve of normal and UV-ed coli (Multiplicity of infection = 5, in TG medium)

の増加がみられた。この結果この現象が温度降下によつて起るものではないらしく思われる。c) 又二重寒天法を利用するために、呼吸に問題があることも考えられるので、軟寒天を使用せず、ファージ感染菌液を寒天板上に直接塗付する方法で測定したが、この場合も(A部分)の増加があることがわかった。d) TG 培地にアミノ酸が欠けているために、この様な現象が起る可能性が考えられるので、カザミノ酸を補った TG 培地で培養した菌について、上の様な検討を行つたが、この様な菌にも(A部分)の増加を示す性質のあることがわかった。カザミノ酸を含む TG 培地培養菌は、先に述べた様に菌の成長も burst size も PG 培地培養菌と殆ど同じであつたにもかゝらず、この様な差異を示すことは興味ある問題である。e) 紫外線照射の際に菌体を懸濁している液と、この現象との間の関係も又問題になるので、懸濁液として PG 培地、TG 培

地及び T_2 吸着液¹²⁾を用い、両培地培養菌について検討を行つたが、何れの液を用いても PG 培地培養菌は(A部分)の現象を示さず、TG 培地培養菌はすべてのこの現象を示した。以上のことからこの現象を示す性質が、培養時の培地によつて菌に植えつけられることが想像されるが、その詳細は不明である。

多重度 5 で T_2 感染させたときの、TG 培地培養の菌の one step growth curve を第 9 図に示す。この場合の紫外線照射条件は、菌体内合成の検討を行つたときに主として行つたものであり、この様な条件下 (30 cm, 5 分) で活性ファージの出現の模様を知るために行つた実験である。多重度 5 で T_2 ファージを感染させると当然溶菌阻害の現象を考えなければならない。この際菌体内活性ファージの出現時刻を知りたかつたので、シアン法により人工的に溶菌させ、菌体内に出現する活性ファージの測定を行い、eclipse period を決定した。しかし我々の用いた T_{2r}^+ は、感染後遊離のファージを血清で除き、すぐにプレート出来る濃度にまで稀釈して培養すると、溶菌阻害の現象を示さず、殆ど単一感染の場合と同様に溶菌する様に思われる。このためこの系についても参考のために菌体外放出活性ファージの測定も行い、一応 latent period を決定した。(第 8 図に細線でこれを示す。) 併し、感染を稀釈せずにそのまま培養しておく、第 8 図に示す様に溶菌が阻止されていることが観測される。 3×10^8 /ml 位の正常菌と照射菌 (30cm, 5 分) に多重度 5 で T_2 ファージを感染させ、そのまま培養して比濁度の時間的な変化を見ると、両系とも感染直後に若干比濁度の減少があるが、その後正常感染系ではこれが若干増加し、照射感染系では殆ど一定の値をとり、それ以降の両系に於ける溶菌が阻止されていることを示す。尚両系での感染後のこの濁度の増加の有無も、両系の burst size の大小に関係することが考えられる。又この様な稀釈してない感染液から、培養開始後色々な時間間隔で試料を取出し、その都度試料を血清処理して直ちに稀釈してプレートすると、上と同様に感染菌数が一定の値に止まっていることがわかった。照射感染菌の作るブランクは、latent period が長くなるために、遊離のファージの作るブランクよりも可成小さいので、この両者は判別可能である。始めから稀釈して培養した場合に、溶菌阻止が完全におこらない原因は不明である。

第 9 図から得た eclipse period, 及び burst size の値を第 1 表に示す。この結果、多重感染でも単一感

染でも大体同様にしてファージが産生されることがわかつた。

総 括

大腸菌は紫外線照射によつて不活性化されても、 T_2 ファージの感染によつて子ファージを産生するが、照射する紫外線の dose によつて latent period が長くなり、burst size が減少して行く。この現象を TG 培地と PG 培地を用い、色々な dose で実測した。その結果どの培地を用いても、紫外線照射によつて同様な影響を受け、15ワット紫外線光源から30cmの距離で5分間の強烈な照射を受けた菌で T_2 ファージが増殖する場合の latent period の増大は、PG 培地では約20分、TG 培地では約30分であり、burst size は何れも約1/3に減少することがわかつた。尚TC培地培養菌では、 T_2 の感染の段階に不完全感染とでも云うべき現象を示す段階があり、このためにTG培地培養照射菌の latent period の遅れを一層大きくするものと思われるが、その詳細は不明である。

本研究に当り御指導と御討論を載いた京都大学ウイルス研究所渡辺格教授並びに渡辺研究室の諸兄に厚く感謝する。尚本研究には研究費の一部として文部省科学研究費を使用した。

文 献

- 1) Anderson, T. S.: The Growth of T_2 Virus on Ultraviolet-killed Host Cells, *J. Bact.*, **56**, 403-410, (1948)
- 2) Watanabe, I., Suzuki, K.,

- Nakamura, M.: Studies on the reproduction of bacterial virus. On the nucleic acid synthesis in ultraviolet ray-injured *E. coli*, *J. Biochem.*, **39**, 75, (1952)
- 3) Rouyer, M., and Latarjet, R.: Augmentation du nombre de bacteriophage en presence de bacteries sterilisees par irradiation, *Ann. inst. Pasteur*, **22**, 89-94, (1946)
 - 4) Herriott, R. M., and Price, W. H.: The Formation of Bacterial Viruses in Bacteria Rendered Non-Viable by Mustard Gas, *J. Gen. Physiol.*, **32**, 63-68, (1948)
 - 5) 渡辺格, 松下宏; 「バクテリオファージ増殖に関する考察」過酸化水素処理菌のファージ産出能について *ウイルス* **2**, 1, 67-69, (1952)
 - 6) Sekiguchi, M. and Takagi, Y.; Noninfectious Bacteriophage Produced by the Action of Mitomycin C. *Virology*, **10**, 160, (1960)
 - 7) Hershey, A. D.; An Upper Limit to the Protein Content of the Germinal Substance of Bacteriophage T_2 , *Virology*, **1**, 108-127, (1955)
 - 8) Adams, M. H.; Methods of Study of Bacterial Viruses. *Methods of Medical Research*, (I. H. Comroe, editor), Chicago, The Year Book Publishers, **2**, 1, (1950)
 - 9) 中村正好; ファージ増殖に対する紫外線の影響, 第2報 紫外線照射菌のファージ感染後の核酸及び蛋白質の合成について, *ウイルス* **11**, 45-52 (1961).
 - 10) 渡辺格, 佐々木真; 日本化学会生物化学討論会にて発表(1952)
 - 11) Deering, R. A., and Christian, E.; Action of T_2 Bacteriophage on Filamentous *E. coli*, *Virology*, **6**, 150, (1958)
 - 12) Hershey, A. D., and Chase, M.: Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage., *J. Gen. Physiol.*, **36**, 39, (1952)