原 著

溶原化と宿主依存性変異*

萩原 新** 植竹 久雄 富山 朔二

LYSOGENIZATION AND HOST-CONTROLLED VARIATION

SHIN HAGIWARA, HISAO UETAKE and SAKUJI TOYAMA

(Department of Microbiology, Sapporo Medical College, Sapporo)

[受稿 12 月 27 日, 1962]

前報において $\mathcal{E}^{15}$ [A] を A($\mathcal{E}^{34}$) に感染させた場合、 $\mathcal{E}^{15}$ のプロファージ化が遷延することを認め、(萩原, 植竹, 1961)その機転を追求した結果、宿主依存性変異 (HCV) によるものであろうという推論に達したことを報告した (植竹, 萩原, 1962)。他方われわれは $\mathcal{E}^{15}$ およびその他のファージの HCV の機転についても研究中であるが、この方面の研究から、HCV に易熱性因子が関係することおよび複数感染によりある程度 HCV によるファージ増殖阻止が打破できることを発見した (植竹, 中川, 1960: 富山未公表)。そこで A($\mathcal{E}^{34}$)における $\mathcal{E}^{15}$ [A]のプロファージ化の遷延が HCV によるのであれば、これと易熱性因子との関係が認められるのではないか、あるいは複数感染によりプロファージ化が促進されるのではないかということが予想されてくる。これらの点をしらべたのが本報の内容である。

実験材料と実験方法

菌株、ファージ株、抗ファージ血清、溶原性検査法等総て前報 (植竹, 萩原, 1962) に同じ。その他に用いた S. butantan (=I-1) は国際標準株である。

高い m.o.i. での感染: A($\mathcal{E}^{34}$)の通気培養対数増殖期細胞 (約 10^8 /ml) に $\mathcal{E}^{15}$ [A] を m.o.i. 約 20 の割合で感染させ、吸着 10 分後抗ファージ血清加ブイオンで希釈して遊離ファージを中和。さらに 10 分後抗ファージ血清加

ブイオンおよびブイオンに希釈した。前者については適当な間隔で平板にまいて生菌数の推移をしらべ、生じた集落についてはレプリカ法で $\mathcal{E}^{15}$, $\mathcal{E}^{34}$ についての溶原性集落の割合をしらべた。後者については型のごとく、時間を逐つて感染中心および増殖ファージ数をしらべた。

対照として A 細胞の培養と $\mathcal{E}^{15}$ [A] の組合せでも同様の実験を行なった。

溶原化におよぼす加熱の影響検査法: A($\mathcal{E}^{34}$) の通気培養増殖期細胞 (約 2×10^8 /ml) 1 ml を小試験管にとり 50°C の恒温水槽に 1.5 分おき、直に 37°C に移して 1 分後予め 37°C に保つてある $\mathcal{E}^{15}$ [A] ファージ液を等量加えて感染。10 分間吸着後、抗ファージ血清加ブイオンで希釈して遊離ファージを中和、さらに 10 分後抗ファージ血清加ブイオン、およびブイオンに適当に希釈した。以後の前者、後者についての検査は前項に同じ。

実験成績

1. 感染の度合を高くした場合

感染の度合 (m.o.i.) を高くして 24.2 で $\mathcal{E}^{15}$ [A] を A ($\mathcal{E}^{34}$) に感染させた場合 $\mathcal{E}^{15}$ の溶原化がどうなるかをしらべた成績が Fig. 1 である。

Fig. 1 は感染後大体 3 時間位で溶原化が成立することを示している。m.o.i. を 20, 29 とした実験でもほぼ同様に 3 時間位で溶原化が成立すると見られる成績が得られた。これに反して m.o.i. を 6.1, 7.5, 8.9 とした場合には感染後 5 ~ 6 時間以内に溶原化が成立したとの証拠は得られなかつた (Table 1)。

また m.o.i. を低くした場合さらに 1 つの注目すべき

* 本研究には 文部省科学研究費の補助 Waksman 財団からの研究助成及び U. S. Army Research and Development Group (Far East) からの助成 (DA-92-557-FEC-35775) をうけた。

** 札幌医科大学微生物学教室

Fig. 1 Process of lysogenization in strains A and A(ϵ^{34}) infected with phage ϵ^{15} [A] at m. o. i. of 5 and 24.2, respectively

Table 1 Time required for establishing lysogeny at various multiplicities of infection in various combinations among bacterial and phage strains

Bacterial strain	Phage	m. o. i.	Surviving cells*(%)	$\mathcal{E}^{15}$ -producing colonies (号)	Prophage state was established in (hours)
A	$\mathcal{E}^{15}$ [A]	1.05	47.1	43.3	ca. 3
A ($\mathcal{E}^{34}$)		5.0	35.0	99.9	ca. 3
		6.1	26.1	44.8	<6
		7.5	25.0	51.2	<6
		8.9	36.7	86.7	<6
		20.0	65.5	98.7	ca. 3
		24.2	74.6	98.9	ca. 3
$\mathcal{E}^{15}$ [A($\mathcal{E}^{34}$)]	4.8	46.2	92.7	ca. 3.5	
	9.4	53.3	98.9	ca. 3.5	
	10.2	69.1	99.1	ca. 3.5	
Heated A($\mathcal{E}^{34}$)	$\mathcal{E}^{15}$ [A]	3.9	23.3	33.6	<6
		5.0	21.9	42.9	<6
		15.0	17.1	97.3	ca. 3-4
		15.4	20.2	98.1	ca. 3-4

* Surviving cells were plated out 20 minutes after infection and the resulting colonies were tested for ϵ^{15} lysogenicity by replica plating.

事実が認められる。これは Table 1 に示すように、m.o.i. を 6.1, 7.5 にした場合、感染 20 分後に生残細胞を plate して得られた集落の中それぞれ 44.8%, 51.2% しか ϵ^{15} 産生集落が認められないことである。前回の報告の m.o.i. 8.9 の場合でもこの値は 86.7% にすぎない。これは ϵ^{15} [A] を A に感染させた場合には m.o.i. 5 で同じ時期に 99.9% が ϵ^{15} 産生集落を示す事実 (Table 1 および Uetake et al., 1958) と対比すると興味があ

る。この事実は少数ファージが感染した場合には注入されたファージ DNA がこわされてしまうことを暗示するのかもしれない。

2. 宿主細胞に対する加熱の影響

宿主細胞を軽く加熱してから HCV を起したファージを感染させると非加熱細胞に比べ、平板効率が著しく高くなることをわれわれは知った (未公表) ので、これを本研究に応用してみた。A (ϵ^{34}) を加熱後、 ϵ^{15} [A] ファージを m.o.i. = 3.9, 5.0, 15.0, 15.4 の割合で感染させ、 ϵ^{15} による溶原化の過程をしらべた。その結果では、m.o.i. が 3.9, 5.0 では ϵ^{15} の溶原化は 6 時間以内には証明できなかった。m.o.i. が 15, 15.4 では感染後 180~240 分で溶原化が成立することが認められたが、m.o.i. が高いので宿主細胞の加熱によるのではなくて m.o.i. が高いためと考えた方がよさそうである。m.o.i. 3.9, 5.0 のとき感染 20 分後に plate して生じた生残菌集落の中それぞれ僅か 33.6%, 42.9% しか ϵ^{15} を産生しないという点も前の実験とよく一致しているといえよう。

総括、考按

実験 1 から ϵ^{15} [A] を A (ϵ^{34}) に感染させる場合でも、1 ケの細胞当たり多数のファージを感染させれば約 3 時間位で ϵ^{15} のプロファージ化が成立することが知られた。これは、 ϵ^{15} [A (ϵ^{34})] を A (ϵ^{34}) に感染させる場合には m.o.i. を低く 5 位にしても 3 時間位で ϵ^{15} がプロファージ化する事実 (植竹, 萩原, 1962) と共に、低い m.o.i.

では $\mathcal{E}^{15}[A]$ による $A(\mathcal{E}^{34})$ の溶原化が成立しにくいのは, $\mathcal{E}^{15}$ の HCV によると考えて説明するとすべて一元的に説明ができる。

われわれは別の実験で, $\mathcal{E}^{15}[A]$ を *S. butantan* に感染させる場合, 単数感染では平板効率が 10^{-3} であるが複数感染では平板効率を 1 まで上げることができることを見出している(未公表), これと上述の複数感染による溶原化の促進とは互に符合する所見といえるであろう。

他方 $\mathcal{E}^{15}[A]$ の *S. butantan* に対する平板効率は, 菌細胞を感染直前 $49\sim 50^\circ\text{C}$ に短時間加熱するだけでも著しく上昇することも見出している(未公表)ので, $A(\mathcal{E}^{34})$ を加熱してから $\mathcal{E}^{15}[A]$ を感染させてみたのであるが, この実験では溶原化が促進されたといえる成績は得られなかった。m.o.i. の高い例でのみ $3\sim 4$ 時間で溶原化が認められたが, これはむしろ多数感染のためと考えた方がよさそうである。これは何故であろうか? $\mathcal{E}^{15}[I-1]$ は A の上で 10^{-4} の平板効率しか示さない。この場合にも複数感染で平板効率をあげることはできるが, 逆の組合せ(上記)と異り非常に高い m.o.i. を必要とする。また加熱による平板効率の上昇は逆の組合せ程著しくない。そしてこれは A 細胞が加熱により死滅しやすいためと考えられる(未公表)。そして $A(\mathcal{E}^{34})$ は A に由来する菌株であるから加熱の影響が認められ難いのではないかと考えられる。 $A(\mathcal{E}^{34})$ に $\mathcal{E}^{15}[A]$ を感染させた場合には m.o.i. を高くすると生残菌がふえるのに, 加熱 $A(\mathcal{E}^{34})$ に $\mathcal{E}^{15}[A]$ を感染させた場合には, m.o.i. を高くして溶原化が 3 時間位で成立するような条件でも, 生残菌数はふえない。これも加熱 $A(\mathcal{E}^{34})$ が死にやすく, 溶菌に傾きやすいためであろう(死滅細胞は総て感染中心を作る)。

他方, 加熱効果は 37°C に $30\sim 40$ 分おくと失われて, 加熱前の状態に戻ることも知られている(未公表)。而も $\mathcal{E}^{15}$ がプロファージになるには さらに長い時間を必要とする。それで加熱の影響は余りはつきりしないことになるのかも知れない。

然しそれにしても HCV の実験成績とこの溶原化過程の実験成績がそれぞれによく符合するということは, 溶原化が HCV で影響されることを示すものであろう。

$\mathcal{E}^{15}[A]$ と $A(\mathcal{E}^{34})$ との組合せと異り, $\mathcal{E}^{15}[A]$, $\mathcal{E}^{15}[A(g_{341})]$ と菌株 A, $A(g_{341})$ との交叉組合せでもあるいは $g_{341}[A]$ と菌株 A, $A(\mathcal{E}^{34})$ との組合せでも, プロファージ化への干渉は全く認められなかったが(前報), Table 2 はこれらの組合せでは HCV が認められないのに, $\mathcal{E}^{15}[A]$ と $A(\mathcal{E}^{34})$ の組合せでのみ HCV が認められることを示しているのは興味深い。

また $\mathcal{E}^{15}[A(\mathcal{E}^{34})]$ では $A(\mathcal{E}^{34})$ よりも A の上で EOP が高いが, $\mathcal{E}^{15}[A(\mathcal{E}^{34})]$ による A の溶原化は $\mathcal{E}^{15}[A]$ に

Table 2 Efficiency of plating (EOP) of $\mathcal{E}^{15}$ propagated on various strains

phage strain	EOP on			
	A	$A(\mathcal{E}^{34})$	$A(g_{341})$	$A(\mathcal{E}^{34})$
$\mathcal{E}^{15}[A]$	1	3×10^{-1}	1	
$\mathcal{E}^{15}[A(\mathcal{E}^{34})]$	1	5×10^{-1}		
$\mathcal{E}^{15}[A(g_{341})]$	1		1	
$g_{341}[A]$	1	0		1

よる A の溶原化と同じように, m.o.i. が低くても感染後 3 時間位で完了することも指摘に値する。これらの事実は何れも溶原化が HCV の影響をうけるとの考えに都合がいい。

さて, 前報で m.o.i. 5 位で $\mathcal{E}^{15}[A]$ を $A(\mathcal{E}^{34})$ に感染させた場合, 感染後 6 時間たつても溶原化が成立しきらないことを報じたが, そのさいよく観察すると, $\mathcal{E}^{15}$ 産生集落の割合を示す曲線は水平ではなくてやや不規則に軽度上昇を示していた(前報第 1 図参照)。これは今回の実験から考えて, 多数のファージの感染をうけた細胞では preprophage 状態にある phage genome が細胞分裂に伴い segregate するためにあのような曲線を生じたものと考えられる。

次に Table 1 は, ファージとして $\mathcal{E}^{15}[A]$, $\mathcal{E}^{15}[A(\mathcal{E}^{34})]$, 菌株として A, $A(\mathcal{E}^{34})$, 加熱 $A(\mathcal{E}^{34})$ を用い, 種々の組合せでかつ種々の m.o.i. で感染させた場合の生残り細胞と, その中での “ $\mathcal{E}^{15}$ を産生する細胞” それぞれの割合を括めたものである。この表で気づくことは, 1) 感染後 20 分で plate した生残り細胞集落が高率に $\mathcal{E}^{15}$ を産生しているような場合には大体 3 時間位で溶原化が完了するのに, 低率の場合には溶原化の完了までに 6 時間以上もかかっているということと, 2) 後者のような例では感染後 20 分でまいた集落でしらべると, $\mathcal{E}^{15}$ 産生集落が m.o.i. から予想されるよりもはるかに少いという点である。2) の点は注入されたファージ DNA がこわされてしまうことを暗示するのではなからうか。そして少数のファージが感染した場合には DNA がこわされて細胞は治癒し, 多数のファージが感染した場合には一部の DNA がこわされても, 無傷の DNA がこのころで “ $\mathcal{E}^{15}$ 産生細胞” になるものと推定したらどうであろう。これは HCV の機転を暗示するものかも知れない。

次の問題は m.o.i. が高いと, ファージ DNA と菌染色体が衝突する確率が高くなるので早く溶原化するのはないかとの疑問であろう。しかし答は否である。何故なら $\mathcal{E}^{15}[A]$ を A に感染させた場合には m.o.i. を低く 1 位にしてもやはり 3 時間位で溶原化が成立する (Table

1).

次に $\mathcal{E}^{15}[A]$ を $A(\mathcal{E}^{34})$ に感染させた場合に長時間に亘り感性細胞の segregation がつづくということは、ファージ genome が単数でふえもせず細胞質に長く存続することを暗示する。他方 $\mathcal{E}^{15}[A]$ を A に感染させた場合にもあるいは $\mathcal{E}^{15}[A(\mathcal{E}^{34})]$ を $A(\mathcal{E}^{34})$ に感染させた場合にも、プロファージ化する前に単数の preprophage の状態がしばらく存在すると思われる。にもかかわらず $\mathcal{E}^{15}[A]$ を $A(\mathcal{E}^{34})$ に感染させた場合には preprophage の状態が長くつづき、後者では長くつづかないのは何故であろうか？

$\mathcal{E}^{15}[A]$ の DNA と $\mathcal{E}^{15}[A(\mathcal{E}^{34})]$ の DNA とでその構造が全く同一であるならこのような差はおこり得ない筈である。すると $\mathcal{E}^{15}[A]$ の DNA は A の菌染色体に、 $\mathcal{E}^{15}[A(\mathcal{E}^{34})]$ の DNA は $A(\mathcal{E}^{34})$ の菌染色体に付着しやすい構造にそれぞれあるのかも知れない。そしてもしそうなら、その構造は $\mathcal{E}^{15}$ が A あるいは $A(\mathcal{E}^{34})$ でそれぞれ増殖することにより得られた構造であろう。それなら $\mathcal{E}^{15}[A]$ が $A(\mathcal{E}^{34})$ に感染した場合に、その DNA が $A(\mathcal{E}^{34})$ の中で一旦複製されれば新に複製された DNA は $A(\mathcal{E}^{34})$ 染色体に付着しやすい形に変わるのではなかろうか。 $\mathcal{E}^{15}[A]$ でも多数を $A(\mathcal{E}^{34})$ に感染させると普通に溶原化がすすむのは、多数感染により注入された DNA が複製されやすくなるためと考えれば説明がつく。そしてこの考えは HCV をおこしたファージが複数感染で増殖できるようになる事実で裏付けされる(植竹, 中川, 1960)。 $\mathcal{E}^{15}[A(\mathcal{E}^{34})]$ は A の方で平板効率がよいということは、 A で増殖、複製しやすいことを意味する。したがってこの場合には多数感染の条件にしくなくても溶原化がおくれないのも、同じ原理で説明がつく。

要するに、ファージ DNA の構造は最後に増殖した宿主細胞により若干異り、それが次に異なる宿主細胞に感染した場合には、感染した細胞で複製しやすいかしくいかに関係し、複製しにくく、感染ファージ DNA の構造そのままの時にはプロファージ化しにくく、複製しやすい時には新しい宿主細胞に支配される構造の DNA が複製されプロファージ化しやすくなると仮定すると、われわれのデータはすべて説明がつく、これはこの研究と平行して行なわれた HCV の実験成績とも λ ファージについての最近の報告 (Arber and Dussoix, 1962; Dussoix and Arber, 1962) とも符合する。またプロファージ化前にファージ DNA の複製がおこることは λ (Stent &

Fuerst, 1956), P22 (Luria et al., 1958), P2 (Bertani, 1962) についての研究で暗示されている。P² では溶原化も重複溶原化も m.o.i. に影響されないが、これは溶原化前に DNA の複製がおこると仮定すると容易に説明がつく。

結 論

A で増殖した $\mathcal{E}^{15}$ を $A(\mathcal{E}^{34})$ に感染させた場合、m.o.i. が 9 では $\mathcal{E}^{15}$ のプロファージ化は 6 時間以内には完了しないが、 $A(\mathcal{E}^{34})$ で増殖した $\mathcal{E}^{15}$ を $A(\mathcal{E}^{34})$ に感染させると、m.o.i. が 5 以下でも 3 時間位で $\mathcal{E}^{15}$ のプロファージ化が完了する。他方 A で増殖した $\mathcal{E}^{15}$ でも m.o.i. を高くして $A(\mathcal{E}^{34})$ に感染させると、3 時間位で $\mathcal{E}^{15}$ のプロファージ化が完了する。これらの成績は、溶原化が HCV の影響をうけることを示すものと解されるが、それらの点について考察を加えた。

Summary

When cells of *S. anatum* lysogenized with phage ϵ^{34} ($=A(\epsilon^{34})$) are infected with phage ϵ^{15} propagated on *S. anatum* ($=A$) at multiplicity of infection (m. o. i.) of 9 or less, it takes longer than 6 hours before phage ϵ^{15} establishes itself as prophage. Contrary to this, when cells of *A(\epsilon^{34})* are infected with ϵ^{15} propagated on strain *A(\epsilon^{34})*, prophage state is established in about 3 hours after infection even at m. o. i. of 5. And on the other hand, when cells of *A(\epsilon^{34})* are infected with ϵ^{15} propagated on strain *A* at high m. o. i., establishment of prophage state is completed in about 3 hours after infection.

These and other results indicate that lysogenization may be affected by host-controlled variation.

文 献

- 1) Arber, W. and Dussoix, D.: *J. Mol. Biol.* 5, 18-36 (1962). —2) Bertani, G.: *Virology* 18, 131-139 (1962). —3) Dussoix, D. and Arber, W.: *J. Mol. Biol.* 5, 37-49 (1962). —4) 萩原, 植竹: 第9回ウイルス学会総会演説, (1961). —5) Luria, S. E., Fraser, D. K., Adams, J. N. and Burrous, J. W.: *Cold Spring Harbor Symposia Quart. Biol.* 23, 71-82 (1958). —6) Stent, G. S. and Fuerst, C. R.: *Virology* 2, 737-752 (1956). —7) 植竹, 萩原: ウイルス, 投稿中. —8) Uetake, H., Luria, S. E. and Burrous, J. W.: *Virology* 5, 68-91 (1958). —9) 植竹, 中川: ウイルス, 10, 431-432 (1960).