

OP_1 phage(Xant homonas oryzae bacteriophage)の 増殖に関する研究 : I. 種々の条件下の一段増殖実 験

脇本, 哲
九州大学農学部植物病理学教室

<https://doi.org/10.15017/21355>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 15 (2), pp.151-160, 1955-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

OP₁ phage (*Xanthomonas oryzae* bacteriophage) の増殖に関する研究*†

I. 種々の条件下の一段増殖実験

脇 本 哲

Studies on the multiplication of OP₁ phage (*Xanthomonas oryzae* bacteriophage)

1. One-step growth experiment under various conditions

Satoshi Wakimoto

緒 言

Bacteriophage の増殖の時間的、量的究明に常に応用せられる one step growth experiment (一段増殖実験) は Ellis and Delbrück¹⁾ に始まり、種々の bacteriophage の増殖機構の研究手段として貢献しつつある。蓋し、one-step growth experiment の意義は、phage 増殖の cycle を一段のみに限つて、phage の bacteria への吸着侵入から bacteria の phage 放出迄の経過を時間的に明らかにし、更に phage に感染された個々の bacteria から放出される phage の粒子数を量的に明らかにするにある。phage の bacteria への吸着の初段階は、イオンの、酵素的に説明され^{2,3)} 従つてこの吸着現象は極く短時間内に起り、実際的には吸着されるべき phage の 90% 以上は 5 分間以内に反応することも多くの例で明らかである。この吸着侵入の現象が即ち bacteria の phage による感染であるが、この現象は、susceptible bacteria と lytic phage との間に於ては、それに続く latent period を経て bacteria が崩壊し、再生産された phage を培養基中に放出する所謂 burst なる現象を誘起する。

Bacteria の生体内に於て latent period に起る phage の再生産の複雑なる機構は次第に暗中摸索の域を脱しつつあり、特に種々の bacteria-phage complex の生理追求に利用可能の新しい武器を用いた生化学的な研究手段により、或は lysogenic strain 等を利用した生物学的な研究手段により、或は又、超薄切片ミクローム、電子顕微鏡等の研究手段による直接観察により急速に進展しつつある。

One-step growth experiment を応用した種々の内的外的諸条件の phage 増殖の効果を究明も亦直接的或は間接的にこの latent period に起る反応の考察上の一助ともなる。ここに著者は phage 増殖に直接影響すると思われる数種の要因の差異によつて誘起

* 九州大学農学部植物病理学教室業績。

† 本実験に当り終始直接御指導戴いた吉井甫教授、木場三郎助教授及び松井千秋氏外教員諸氏に謝意を表す。

される増殖過程の変化と、その結果の差異につき 2, 3 の実験を行い、更に phage の増殖現象の植物病理学的な実際的应用面に直接関連の予想される若干の条件下に於ける増殖の様相をも one-step growth experiment により追求した。

材 料

供試 bacteria は *X. oryzae* No. 49³¹⁾ を用い、indicator strain としてもこれを使用した。Bacteriophage は vitamin free casein hydrolysate の培養基に約 10^8 per ml. に稀釈した OP₁ phage (*X. oryzae* bacteriophage)^{29, 30, 32)} を用いた。

One-step growth experiment に利用した抗血清は、毎週 $10^8 \sim 10^9$ per ml. の phage suspension 約 4 ml. を連続 10 回注射した家兎から得られたもので、下式により示される phage の不活性化反応速度恒数 $K^{33)}$ は 7.3 であつた。

$$K = 2.3 D/t \times \log P_0/P$$

P_0 : $t=0$ の時の活性 phage 粒子数

P : t 分後の serum 混液中の活性 phage 粒子数

D : Phage-serum mixture に於ける serum の最終稀釈倍率

K : Phage の不活性化反応速度恒数

この等式から一定量の phage 粒子を完全に不活性化するに要する抗血清の量は演繹的に算出し得、実際的にはその算出量の数倍を用いた。

One-step growth experiment に用いた種々の培養基の組成は下記の如きものであり、以下これらの培養基の組成は夫々の略称で示すこととする。

(1) Na-Glutamic acid	2. gm.
KH ₂ PO ₄	2.
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.05
sucrose	20.
H ₂ O	1,000.
pH	7.

略称：農研合成培養基²⁷⁾

註：これは農林省農業技術研究所に於て、*X. oryzae* の為最良の合成培養基と認められているところのものである。

(2) Casein hydrolysate (10% 液)	1. ml.
NaNO ₃	1. gm.
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.
NaCl	2.
Sucrose	15.
H ₂ O	1,000.
pH	7.

略称：Ch 半合成培養基

- (3) Vitamin free casein hydrolysate (10% 液) 2. ml.
 H₂O 1,000.
 pH 6.5
 略称: Vf Ch 半合成培養基
- (4) Vitamin free casein hydrolysate (10% 液) 2. ml.
 CaCl₂ 0.5 gm.
 H₂O 1,000.0 pH
 pH 6.5
 略称: Ca Vf Ch 半合成培養基
- (5) Potato 300. gm.
 Ca(NO₃)₂ 0.5
 Na₂HPO₄·12H₂O 2.
 Sucrose 15.
 Peptone 5.
 H₂O 1,000.
 pH 7.
 略称: 馬鈴薯半合成培養基
 註: Plating にはすべてこれに 2% の agar を加えたものを用いた。
- (6) 稻葉 0.2 gm. を磨碎して 10 ml. の蒸溜殺菌水と共に搾汁し, 6,000 rpm, 15 分間の遠沈で植物体の破片, 雑菌等を除いたもの. pH 6.5
 略称: 稻葉搾汁培養基

方 法

One-step growth experiment の詳細な方法は大体 Adams²⁾に従った。概略次の様である。即ち先ず 0.9 ml の培養基に予め馬鈴薯半合成培養基斜面に 24 時間培養しておいた bacteria を 10⁶~10⁷ per ml. 位の濃度に suspend し, それに約 10⁸ per ml. の phage suspension の一定量 (multiple infection, single infection 夫々の場合により異なる) を加えて 5 分後, 加えた phage の内 free の状態に残つたもののみを不活性化するに十分な anti-phage serum の一定量を加え, 5 分間に bacteria への吸着の起らなかつた free の phage を抗血清の 5 分間の反応により不活性化する。(これを検定するには次に述べる growing tube の一部を 6,000 rpm, 10 分間遠沈して bacteria-phage complex を落とし, 上澄を plaque count すればよい。) 然る後, 予め用意しておいた 0.9 ml. の培養基 1 本と, 4.95 ml. の培養基 2 本を用い稀釈を行い, 第 1 のもの (first dilution tube 1:10), 第 2 のもの (second dilution tube 1:1,000), 第 3 のもの (growing tube 1:100,000) を得, その最後の growing tube より, phage 感染後 15 分より 5 分間置きに plating method^{5,33)} により active phage の定量を行い, その増殖過程を追跡する。この操作中の温度は常に一定にしており, 温度に関する実験以外はすべて 30°C の恒温槽を使用した。Plaque の計数は plating の後約 12~15 時間が最も適当である。³³⁾

結 果

I. Casein hydrolysate の phage 増殖への効果

X. oryzae の合成培養基として最も適当とされている農研培養基中に於ては phage は全く増殖し得ず、これに casein hydrolysate を加えれば早速増殖を開始するのは Table 1 より明らかである。

Table 1. Effect of casein hydrolysate for OP₁ phage multiplication.

Hours after infection		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	19	21	23	34
Plaque count	Control	280	—	—	210	230	240	140	240	260	280	240	320	280	—	250	—
	Plus casein hydrolysate													720	830	C	

0.1 ml. of 10% casein hydrolysate solution was added at 19 hours after infection per 10 ml. of medium.

又、*X. oryzae* の培養基として従来用いていた馬鈴薯半合成培養基中に於ては phage は勿論増殖し得るが、この馬鈴薯煎汁の代りに casein hydrolysate を用いた Ch 半合成培養基中に於ても phage は急速に増殖し得る。即ちこれ等の結果から OP₁ phage の増殖には培養基中に casein hydrolysate 中に含まれている有機態の何ものかを必要とすることが判る。なお又、vitamin free casein hydrolysate のみの培養基即ち VfCh 培養基中に於て、約 95% の phage は 15 分間に bacteria に吸着し十分増殖し得ることを知った。

II. Ca⁺⁺ の phage 増殖への効果

VfCh 培養基中に於て phage の増殖可能なことが明らかになったので、Ca⁺⁺ の効果の実験には専らこの VfCh 培養基と Ca VfCh 培養基を使用し、方法は one-step growth experiment によつた。

1. VfCh 培養基中に於ける phage の増殖

Table 2. One-step growth of OP₁ phage in VfCh medium under the condition of multiple infection (30°C).

Minutes after infection		15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	Free phages at 20 min. after infection
Plaque count	I	29	22	25	23	25	28	77	99	84	180	170	176	172	186	0
	II	110	125	135	160	130	160	200	230	720	970	850	950	980	950	0

The number of bacterial cells and phage particles mixed in each experiment.

Experiment 1 : Number of bacterial cells	8.5 × 10 ⁶
Number of phage particles	3 × 10 ⁸
Experiment 2 : Number of bacterial cells	2.8 × 10 ⁷
Number of phage particles	3 × 10 ⁸

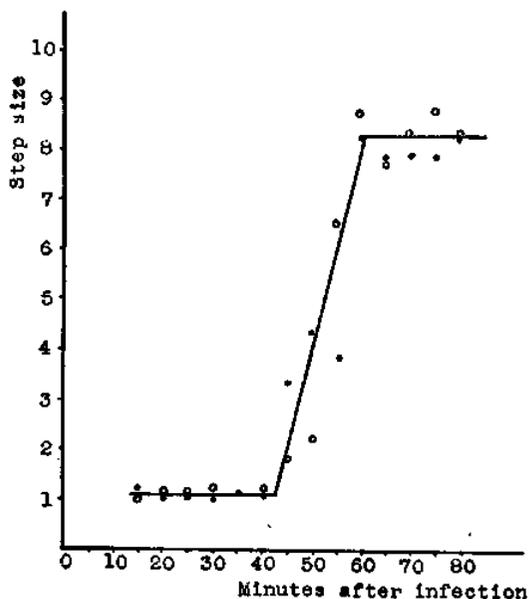


Fig. 1. One-step growth curve of OP₁ phage in VfCh medium under the condition of multiple infection (30°C).

2. CaVfCh 培養基中に於ける phage の増殖

Table 3. One-step growth on OP₁ phage in Ca VfCh medium under the condition of multiple infection (30°C).

Minutes after infection	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	Free phages at 20 min. after infection
Plaque count I	235	220	235	220	215	250	440	1100	1310	2080	2380	2480	2520	2360	0
Plaque count II	78	97	77	76	80	93	200	440	690	990	1040	980	1010	980	0

The number of bacterial cells and phage particles mixed in each experiment.

Experiment 1 : Number of bacterial cells 2.3×10^7
 Number of phage particles 3×10^8
 Experiment 2 : Number of bacterial cells 8.5×10^6
 Number of phage particles 3×10^8

Table 2, Fig. 1 及び Table 3, Fig. 2 から, 両培養基に於ける latent period, rise period 及び average burst size を比較すれば Table 4 の如くである。

尚, single infection に於ても VfCh 培養基中に於ては全く同一の latent period, rise period, average burst size を示した。

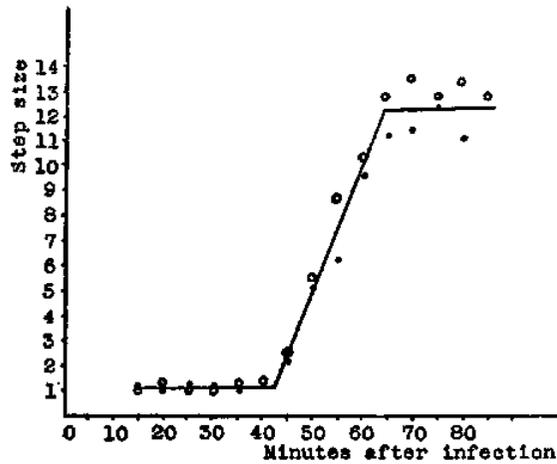


Fig. 2. One-step growth curve on *X. oryzae* in Ca. VfCh medium under the condition of multiple infection (30°C).

Table 4. Effect of Ca-ion on the multiplication of OP₁ phage (30°C)

	Latent period (min.)	Rise period (min.)	Average burst size
VfCh medium	40	20	7
CaVfCh medium	40	20	12

III. 稻葉搾汁培養基中での phage の増殖

Table 5. One-step growth of OP₁ phage in the press juice of rice leaf under the condition of multiple infection (30°C).

Minutes after infection	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	Free phages at 20 min. after infection
	Plaque count	I	13	9	9	10	6	6	4	2	1	1	0	1	
	II	98	49	20	15	8	20	6	5	1	0	2	—	3	0

即ち稲葉搾汁中では phage の増殖は困難である (Table 5).

IV. Phage の増殖に与える温度の影響

Table 6. One-step growth of OP₁ phage at 20° C (I)

Minutes after infection	15	25	35	40	45	50	60	70	75	80	85	90	Free phages at 20min. after infection
Plaque count	270	260	270	220	250	250	260	300	330	320	600	820	

20°C 下に於ける phage の増殖は latent period が約 80 分に延長され、徐々に lysis

を起し free の phage が放出される (Table 6).

Table 6. One-step growth of OP₁ phage at 20°C (II).

Minutes after infection	15	20	25	35	40	45	50	55	60	Free phages at 20 min after infection
Plaque count	500	520	450	500	480	700	850	C	C	0

After infection sample was kept at 30°C for 10 min., then it was incubated at 20°C.

Phage の感染直後 10 分間 30°C に置けばその後 20°C に保つても latent period はあまり延長しない (Table 6).

Table 7. One-step growth experiment on OP₁ phage at 40°C.

Minutes after infection	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
Plaque count	25	5	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	0

The adsorption and the inactivation processes were taken place at 30°C.

40°C に於ては, bacteria-phage complex は急速に表面的には不活性化されてゆく。而してほんの一部のみが約 60 分後に burst を開始するようである (Table 7).

Phage の bacteria への侵入過程とそれに続く free の phage の不活性化過程, 即ち初期の 10 分間を 30°C に置き, 続いて 10°C に放置すれば, phage 生産の能力は保持したまま存在する。而して一定時間後再び 30°C に移せば bacteria は lysis を起し phage を放出する。この結果は Table 8 の如くである。

Table 8. Effect of the temperature changes on the multiplication of OP₁ phage.

Minutes after infection	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	Free phages at 20 min. after infection
Plaque count	80	83	85	81	80	75	86	87	80	83	80	90	85	85	160	170	300	390	450	520	530	0

After infection, bacteria-phage complex was incubated at 30°C for 10 min., then it was incubated at 10°C for 60 min., and after this time it was placed at 30°C.

考 察

One-step growth experiment は多くの phage の増殖現象解析に利用され, 多種類の phage につき, 既に latent period, rise period, average burst size が夫々報告され, 又これ等を左右する要因の究明, 更にその要因から考察され得る増殖現象の本質的探求も次々に為されつつある。

多くの phage に於て latent period は短いものでは数十分から長いものでは数百分の例が報告され, rise period も長短種々で, 更に最適条件下に於ける average burst size

も数個から数百個に渉る広範囲な分散を示している。同一の bacteria に対しても、それを犯し得る数系統の phage は夫々特有の latent period, rise period, average burst size を示し、逆に一系統の phage に対してそれに犯される多数の系統の bacteria に於ても夫々の特性を示す。これ等の特異性は bacteria 或は phage の分類に利用可能なことは既に報告されている²⁷⁾。

本実験の結果、30°C に於ける *X. oryzae* No. 49 に対する OP₁ phage の latent period は約 40 分であり、rise period はそれに続く約 20 分であり、更に VfCh 培養基中に於ける average burst size は約 7 であることが明らかになった。これらは、増殖現象に関係する外界条件により変化するのは勿論であるが、その条件とそれに対する変化の仕方が明らかにされねばならない。

Phage の増殖に対する二価イオンの効果については既に多数の報告があり^{11,16,18,22,26,29,30,31)} 特に Ca⁺⁺ が或 phage では主に吸着に、又或 phage では増殖に必須、又は促進的に極めて重要なことが報告されている。OP₁ phage の *X. oryzae* No. 49 への吸着には改めて Ca⁺⁺ の添加を必要とせず VfCh 培養基中で十分吸着可能である。而してこの培養基に Ca⁺⁺ の添加は phage の細胞内増殖に直接影響し、CaCl₂ の 0.0045 M の存在は、これを全く加えない場合の約 1.7 倍の phage を生産する。然し乍ら、phage の latent period, rise period には全く変化の見られないことは Table 4 より明らかであり、phage の再生産機構の化学的考察に何等かの暗示を与えているようである。

OP₁ phage が VfCh 培養基中で増殖可能なことは判つたが、然らば同様に多種のアミノ酸を含み bacteria の増殖も極めて緩慢ではあるが可能である稲葉搾汁 (6,000 rpm, 10 分速沈上澄) 中に於て何故 phage は bacteria に吸着されても増殖せず次第に不活性化されてゆくか。OP₁ phage は生稲葉中にも存在する事実からして、当然生葉中では増殖していると思われ、ここに植物体の組織化された状態と取出した汁液の状態との間の差異に直面する。この原因は改めて明らかにするつもりである。

X. oryzae の発育適温は 25~30°C であるが、この実験では phage の増殖は 30°C が最適であると考えられる。20°C に於ては latent period は約 80 分に延長されるが、latent period の初期の 10 分間を 30°C に保ち、後 20°C に置けば latent period は約 40 分の正常さを示すことは Table 6 より明らかである。30°C に 10 分間置いた後に於ても 10°C の低温に置けば phage の増殖は全く起らない。然し乍ら phage 生産の能力は依然保持し、30°C に戻すと直ちに増殖を開始する。この時の latent period の内 30°C にある時間は合計 30~35 分間であるから、終始 30°C に置かれた場合の latent period 40 分に比して稍々短いわけである。即ち 10°C 下に於ても phage 生産の一部の過程は進行したものであると思われるが、而も尙長時間 burst の全く見られない事実から、この latent period の中に、この低温で安定な一 stage が存在していると考えられる。35°C に於ては bacteria-phage complex は phage 粒子に發展せず徐々に不活性化されてゆく。然し一定時間後 30°C に移せば生き残つた complex は phage を生産する。40°C に於ては complex は急速に不活性化される。*X. oryzae* の死滅温度は 53°C であり、OP₁ phage の不活性化温度も大体同一であるから、これに較べ、complex の状態に在るものより温度

に敏感なものと思われる。

要 約

I. OP₁ phage (*X. Oryzae* bacteriophage) は vitamin free casein hydrolysate のみの培養基中に於て, *X. oryzae* No. 49 に吸着侵入した場合, 約 40 分の latent period, 20 分の rise period を経て average burst size 約 7 の phage を放出する。

II. 上記培養基に 0.0045 M の CaCl₂ 添加は latent period, rise period には変化を起さないが, average burst size は約 12 に増大する。

III. 稲葉搾汁中に於ては吸着侵入した phage は次第に不活性化されてゆく。

IV. 20°C に於ては latent period は約 80 分に延長されるが, 若し latent period の初期 10 分間を 30°C に置くと latent period は約 40 分の正常さを示す。40°C に於ては bacteria も phage も共に短時間内に死滅する筈はないが, bacteria-phage complex は急速に indicator strain に於て plaque として現われる能力を失う。30°C に於て吸着侵入及び free phage の不活性化を起させた bacteria-phage complex を以後 10°C に放置すれば phage の増殖は見られないが, これを再び 30°C に戻せば phage の増殖は直ちに開始される。即ち 10°C の下では bacteria-phage complex は安定な一 stage を有すると考えられる。

参 考 文 献

1. Adams, M.H. J. Immunol., Vol. 62, 505—516, 1949.
2. Adams, M. H. Method in Medical Research, Vol. 2, 1—73, 1950.
3. Anderson, T. F. J. Bact., Vol. 55, 637—649, 1948.
4. Cohen, S. S. Bact. Rev., Vol. 13, 1—24, 1949.
5. Delbrück, M. Biol. Rev., Vol. 21, 30—40, 1946.
6. Delbrück, M. J. Bact., Vol. 50, 137—150, 1945.
7. Delbrück, M. J. Bact., Vol. 50, 151—170, 1945.
8. Delbrück, M. Arch. Biochem., Vol. 1, 111, 1942.
9. Delbrück, M. Viruses 1950, California Institute of Technology, 1950.
10. Ellis, E.L., and M. Delbrück J. Gen. Physiol., Vol. 22, 365—384, 1939.
11. Fildes, P., Kay, D., and W. K. Joklok The Nature of Virus Multiplication, (2nd Symposium), 194—210, 1952.
12. Fong, J. and A. P. Krueger J. Gen. Physiol., Vol. 32, No. 3, 1949.
13. Fowler, C. B. and S. S. Cohen J. Exp. Med., Vol. 87, 259—274, 1948.
14. Gots, J. S. and G. R. Hunt J. Bact., Vol. 66, 353—361, 1953.
15. Gross, S. R. Genetics, Vol. 37, 587, 1952.
16. Gross, S. R. J. Bact., Vol. 68, 43—49, 1953.
17. Herriot, R.M. and W. H. Price J. Gen. Physiol., Vol. 32, No. 1, 1948.
18. Kay, D. and P. Fildes Brit. J. Exp. Path., Vol. 31, 338, 1950.
19. Latarjet, R. J. Gen. Physiol., Vol. 31, 529—1948.

20. Luria, S. E. and R. Latarjet J. Bact., Vol. 53, 149—163, 1947.
21. Luria, S. E. The Nature of Virus Multiplication, (2nd Symposium), 99—118, 1952.
22. Luria, S. E. and D. L. Steiner J. Bact., Vol. 67, 635—639, 1954.
23. 松井千秋 Virus, Vol. 2, 83—97, 1952.
24. 松井千秋 九大農学芸誌, Vol. 14, 43—49, 1953.
25. 向 秀夫, その他 農核研中間報告, Vols. 6, 7, 1953.
26. 岡部徳夫, 後藤正夫 静岡大農研究報告, Vol. 3, 52—80, 1953.
27. 岡部徳夫, 後藤正夫 静岡大農研究報告, Vol. 3, 81—100, 1953.
28. Potter, N. N. and F. E. Nelson J. Bact., Vol. 66, 508—516, 1953.
29. Puck, T. T., A. Garten and J. Cline J. Exp. Med., Vol. 93, 65—88, 1951.
30. Shew, D. I. Nature, Vol. 164, 492, 1949.
31. 田波 洋 Virus, Vol. 3, 16—23, 1953.
32. 田波 洋 Virus, Vol. 4, 101—108, 1954.
33. 藤本 哲 九大農学芸誌, Vol. 14, 485—493, 1954.
34. 藤本 哲 九大農学芸誌, Vol. 14, 495—498, 1954.
35. Watson, R. S. Antibiotics and Chemotherapy, Vol. 1, 518—522, 1951.
36. 吉井 甫, 吉田照雄, 松井千秋 日植病報, Vol. 17, 117, 1952 (要旨).

S u m m a r y

1. *Xanthomonas oryzae* bacteriophage (OF₁ phage) intruded into *X. oryzae* No. 49 at 30° C in vitamin free casein hydrolysate medium, multiplied with the average burst size of 7, and with the rise period of 20 min.

2. The addition of 0.0045 M of CaCl₂ to the vitamin free casein hydrolysate medium increased the burst size up to 12, with no effect both on the latent period and rise period.

3. Within the press-juice of rice leaves, the phage could not multiply and was inactivated gradually.

4. The temperature seems to affect the latent period and probably the burst size of OP₁ phage. In this experiment the optimum temperature for the growth of OP₁ phage seems to be about 30° C. At 20° C the latent period was prolonged to about 80 min., but when the host-phage complex was kept at 30° C for the initial 10 min. just after infection and then placed at 20° C, the normal latent period of 40 min. was unchanged. In the experiment when the host-phage complex was incubated at 30° C for the initial 10 min. just after infection and then was placed at 10° C, the complex remained at a dormant state. When the latter was again replaced at 30° C, the phage multiplication was continued. At 40° C, the host-phage complex was inactivated rapidly.

Laboratory of Plantpathology,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University