

Pseudomonas solanacearum E. F. Smith ウィルスの 電子顕微鏡的研究(II)

松井, 千秋
九州大学農学部植物病理学教室

<https://doi.org/10.15017/21378>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 15 (3), pp.333-338, 1955-08. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



Pseudomonas solanacearum E. F. Smith

ウイルスの電子顕微鏡的研究 II*†

松 井 千 秋

Electron microscopic studies on bacterial virus
active against *Pseudomonas solanacearum*

E. F. Smith. II

Chiaki Matsui

筆者はさきに *P. solanacearum* B-19 株を攻撃するウイルス A 株 (S₁ 株) の精製を行つた結果、電子顕微鏡下で直径約 70 mμ の球型粒子を得たが、⁸⁾ この粒子は後述の理由により、正に *P. solanacearum* のウイルスと認めらるべきものであり、筆者の記憶にして誤りなければ植物病原細菌のウイルス像として本邦において恐らく初めて観察されたものと云えよう。尤もその後寺田正中及びその共同研究者達¹²⁾によつて、罹病茄子植物から分離した *P. solanacearum* に特異的に作用するウイルスの形態学的観察がなされた。それは頭部 60~70 mμ、尾部 240~380 mμ からなる精虫型粒子であつたことから、*P. solanacearum* のウイルスに於てもまた精虫型のものも存在することが実証されたわけである。

筆者は本報において既報の実験手技及び結果を補足、再検討し、更に新に観察し得た結果について些か考察しようと思う。

本実験は九州大学農学部、専売公社秦野たばこ試験場及び国立遺伝学研究所において行つたものである。スピコン L 型超遠心分離機は 秦野たばこ試験場 (指導、日高醇部長)、遺伝学研究所 (指導、辻田光雄部長) のものを、電子顕微鏡は九州大学電子顕微鏡室、遺伝学研究所のもの (いずれも 50 KV) を使用し、ミクロトームは遺伝学研究所のスベンサー・ウルトラ・ミクロトームを用いた。実験にあつて終始御協力と御援助をいただいた関係研究室の方々の御好意に対し深い謝意を表する。

供試細菌及びウイルスについて

実験に使用した宿主細菌及びそのウイルスは既報にて述べたものである。⁸⁾

宿主細菌の電子顕微鏡像について

細菌は培養の新旧の相違によつても、その電子顕微鏡像にまた相当の相違が見られる。

* 九州大学農学部植物病理学教室業績。

† 本研究に対し、御指導、御教示を蒙つた吉井南教授、木嶋三朗明教授に謝意を表する。
本研究は文部省科学研究助成補助金によつてなされた。

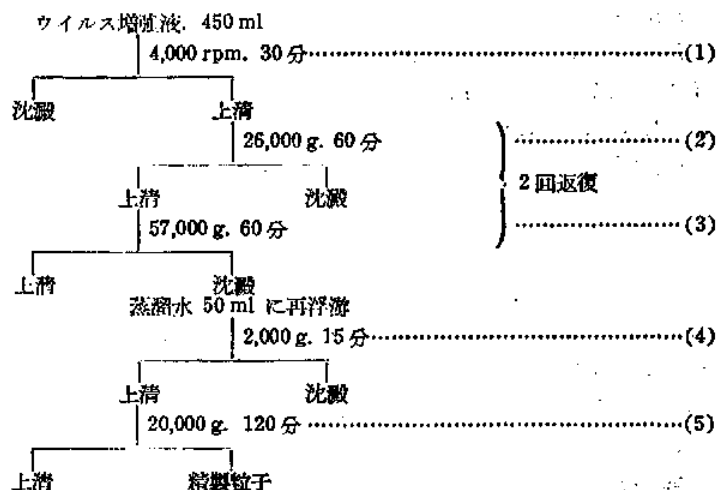
筆者は馬鈴薯葡萄糖液⁽¹⁾ 3 時間、43 時間培養菌（培養温度いずれも 35°C）をそれぞれ遠心分離法により水洗して電子顕微鏡下で形態学的観察を行つたが、その結果は Fig. 1 及び Fig. 2 の如くである。即ち Fig. 1 は対数的増殖期の細菌を示し、細胞内容は均等にして特殊な構造は認められないが、Fig. 2 の示す休止期のものにあつては、原形質内に若干の立体構造が見られる。この種の内部構造について、Wyckoff⁽²⁾ はスピロヘータ、Knaysi⁽³⁾ は *Mycobacterium tuberculosis*, Golderg 及び Morgan⁽⁴⁾ はストレプトマイシンを含む培地に培養した *Erwinia amylovora* においても同様な構造を観察している。その成立機序については Goldberg, Morgan 及び Knaysi⁽⁴⁾ は *Erwinia amylovora* における細胞質内の立体構造はクロマチン物質やリポイドを含むものであるという理由で、恐らく細菌の核であろうという見解をとつている。しかし細菌細胞内の核の存在について Recombination の現象⁽⁷⁾ 或は Temperate virus による Lysogenization⁽¹⁰⁾ 等の実験は、これを間接的に証明し得るに過ぎず、核構造を直接的に観察し得るものは核染色⁽¹⁰⁾ 超薄切片法⁽⁵⁾ による電子顕微鏡像等未だ寥々たる現段階において、僅かに数葉の写真、しかも菌体表面像のみの観察によつて、*Erwinia amylovora* における細胞質内立体構造を論議することは些か妥当を欠くものであらう。従つて Fig. 2 に見られる内部構造が、果して生物学的重要意義をもつものであるか、或は試料作製時又は写真撮影中の偶発事象即ち、乾燥、真空、高熱等の物理的原因によつて招来された原形質の単なる人為的変化に過ぎないかの決定は、本実験の範囲内では一応これを保留するのを妥当とする。更に又超薄切片法⁽⁶⁾ により細菌細胞の内部構造を検討中であるが未だ良好な結果を得るに至らない。故にかくて得た Fig. 3 は筆者が把えた一つの事実として茲に記録するに止める。尚、本菌は極毛性の細菌であるが Fig. 1 及び Fig. 2 共に鞭毛の着生は見られなかつた。

ウイルス精製用培地について

筆者は従来ウイルスの精製に際して、宿主細菌及びウイルスの培養、増強用培地としてカゼイン水解物 1% を加えたウシシキイ氏液⁽¹¹⁾ を使用して多くは良好な結果を得たが、岡部・後藤⁽⁹⁾ の磷酸アンモニウム 蔗糖液は前述の半合成培地に比して遙かに効率的であつた。好ましいウイルス精製用培地の条件として考えられるものは、ウイルスの増強に適していること、種々の粒子、夾雑物が含まれていないこと、粘度が低いこと等であるが、岡部・後藤の培地は *P. solanacearum* 及びそのウイルス (virulent virus) に対しては、およそこれらの諸条件を十分に満すものといえよう。馬鈴薯葡萄糖液はウイルスの増強には適しているが、培地自体に夾雑物が多く、筆者はこれを使用して未だ満足な結果を得るに至らない。

活性粒子の精製について

P. solanacearum のウイルス粒子の大きさに関しては従来もちろん明かにされていない。従つて筆者は粒子の直径を 40~100 m μ と仮定して活性粒子の分離精製を数回行つたが、そのうちで最も有効と考えられた遠心力 g と分離時間との関係を表示すればおよそ第 1 図のようである。



第 1 図 分 割 遠 心 分 離

Centrifugal force, $g = 1118 \times R \times (\text{rpm})^2 \times 10^{-8}$

Performance Index, $P_i = \frac{(\text{rpm})^2}{\ln R_{\max} - \ln R_{\min}}$

Precipitation time for $100 \text{ m}\mu$ particles = $\frac{137 \times 10^8}{P_i}$

$R_{\max}$, $R_{\min}$ は梯形ローターの最長及び最短半径, R はその平均を示す。

第1図において、分離(1)は実験室用低速遠心分離器を用い、細菌を除くにすぎない。分離(2)以下はスピニコL型超遠心分離機を使用し、分離(2)により $100 \text{ m}\mu$ 以上の粒子を除くことに努めた。その沈殿物の電子顕微鏡像は Fig. 4 の如くである。次で分離(3)により淡乳白色ゼリー状の沈殿を得たが、そのウイルス力価は上清に比して遙かに高い。Fig. 5 はこの沈殿物の電子顕微鏡像である。ところで Fig. 5 においては、夾雑物中に均等な球型粒子が混在している。これらの夾雑物を除き均等な粒子のみを蒐集することは容易な業ではないが、そのためには本実験においては $20,000 \text{ g}$, 120 分間の遠心分離が最も有効であつた。分離(5)後の沈殿物は無色透明ゼリー状のもので、Fig. 6 に示すように直径 $70 \sim 80 \text{ m}\mu$ (クロム・シャドイング試料による)の均等な球型粒子のみであつた。しかもそのウイルス力価は極めて高かつた。

精製粒子のウイルス学的活性について

筆者は第1図の分割遠心分離法によつて得た精製粒子のウイルス学的活性を検討するために次のような実験観察を行つた。即ち馬鈴薯葡萄糖液に培養した宿主細菌に精製粒子の浮游液を加え、 35°C 2分間放置後、遠心分離して沈殿菌を電子顕微鏡下で観察した。その結果は Fig. 7 に見られるように菌体表面に球型粒子の吸着が証明された。又 80 分後この沈殿菌浮游液(蒸留水使用)をコロジオン膜を張つた電子顕微鏡用試料支持台に乗せ、乾燥後観察した結果は Fig. 8, 9, 10 の如く、宿主細菌は溶菌崩壊して多数の球型粒子

の放出が証明された。そしてこれらの粒子は精製粒子とほぼ同大であつた。一方精製粒子を使用して行つた one step growth 実験においては、その潜伏期間は約 90 分、新生ウイルス放出量は約 150 個で、この結果を精製前のウイルス浮游液について行つた実験結果に対比するに、何等有意な差異は認められなかつた。筆者は以上の諸点を総合考察して、この精製粒子をウイルス粒子と確認して大過なきものと信ずる。

考 察

およそ未詳の微粒子がウイルス粒子と決定されるに至るには、必要な多くの手続がなされなければならない。即ち、粒子のウイルス学的活性を検べる方法、電子顕微鏡下で粒子のウイルス学的生活環境を見る方法、乃至血清学的検査法等はしばしば用いられる方法であることは周知の通りである。筆者は粒子の精製及びウイルス学的活性、更に電子顕微鏡による生活環の考察等により、Fig. 6 の球型粒子をウイルス粒子と確認することによつて一応の結論に達したことは前述の通りであるが、従来、植物病原細菌のウイルス像として屢々発表されたもので厳しい批判に耐え得るものは寧ろ甚だ稀であると言えよう。

例えば Thornberry 等¹³⁾の報告になる *Xanthomonas pruni* のウイルスもこれを形態学的観点からすれば、限外濾過法により測定された粒子の直径と、電子顕微鏡像より得られたものとの間には納得し難い大きな相違があり、又彼等の電子顕微鏡像が、ウイルス粒子を決定する実験的根拠にも既に若干の問題点が指摘されよう。更に又 Chapman 等²⁾が発表した *Erwinia carotovora* に見る 23 種の多きを数える多種多様の形態を有する雑然たるウイルス及びウイルス様粒子群に至つては、該ウイルスを形態学的に把握する基準となるべき形態の決定自体が既に不可能で、従つてウイルス学的活性が未だ明かならざる現段階において、敢てなされたウイルス粒子の診断的価値にもまた若干の批判の余地が残されるであろう。

細菌ウイルスの形態は諸家の研究結果を総合すれば、細菌の種類をとわず概して球型又は精虫型粒子と一応考えてよいであろう。そして精虫型粒子の尾部は、ウイルス感染に際して菌体表面への附着器として重要な生物学的意義を有することは、既に Anderson¹⁾の電子顕微鏡像によつても理解されよう。Wyckoff³⁾は従来球型粒子とされていた *E. coli* の T₃, T₇ ウイルスも極めて繊細な尾部を有すると報じているが、筆者の精製分離したウイルス粒子においては、これについて肯定的な実証は得られなかつた。又 Fig. 6 と Fig. 7 との粒子において、その直径に若干の差異が認められるが、これは寧ろシャドイングに由来する誤差と解する方が妥当であろう。従つてウイルス A 株粒子の直径はシャドイングを施さない試料即ち Fig. 7 により約 50 m μ と補正さるべきであろう。

摘 要

1. *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith の電子顕微鏡像について若干の形態学的考察を行つた。

2. 分割遠心分離法により *P. solanacearum* のウイルス A 株 (S₁ 株) の増強液より直径約 50 m μ の活性球型粒子を精製分離し、そのウイルス学的活性及び生活環の検討に

より, この粒子が *P. solanacearum* のウイルス粒子であることを確認した。

文 献

- 1) Anderson, T. F. : Cold Spring Harbor Symposia, 18, 197, 1953.
- 2) Chapman, G. B. et al. : J. Bact., 61, 261, 1951.
- 3) Delbrück, M. : "Viruses 1950", California Institute of Technology.
- 4) Goldberg, H. S. and B. S. Morgan : J. Bact., 68, 507, 1954.
- 5) 東 昇 : ウイルスの生物学, 物理学研究班報告会講演, 1954.
- 6) Knaysi, G. : "Elements of Bacterial Cytology", Comstock Pub., 1951.
- 7) Lederberg, J. : Genetics, 32, 505, 1947.
- 8) 松井千秋 : Virus, 4, 128, 1954.
- 9) 岡部徳夫, 後藤正夫 : 静大農学部研究報告, 2, 64, 1952.
- 10) Robinow, C. F. : J. Hygiene, 43, 413, 1944.
- 11) 滝元清澄 : "微生物学及植物病理学実験法", 養賢堂, 1953.
- 12) 寺田正中 : 電子顕微鏡, 3, 16, 1954.
- 13) Thorherry, H. H. et al. : Phytopath., 38, 907, 1948.
- 14) Tsujita, M. and C. Matsui : Proc. of Japan Acad., (in press).
- 15) Wyckoff, R. W. G. : "Electron Microscopy" Interscience Pub., 1949.
- 16) 電子顕微鏡学会関東支部 : "電子顕微鏡のための超薄切片技術" 本田書店, 1953.

Summary

According to the differential centrifugation at 26,000 g for 60 min., 57,000 g 60 min. and 20,000 g 120 min., the spherical particles about 50 m μ in diameter were purified from the suspension of lysed *P. solanacearum* B-19 strain under action of bacterial virus strain A (strain S₁).

After the investigations of viral activity and of one step growth experiment, the particles were defined as the virus particles.

The electron microscope was applicated to the morphological studies of host bacteria and viral life cycle, and the results were as follows:

Fig. 1. *P. solanacearum* from a young culture (8 hours). Well nourished cell, filled with homogeneous protoplasm. (Cr shadowing. $\times 16,000$)

Fig. 2. *P. solanacearum* from an old culture (48 hours). The protoplasm was granulated. (Cr shadowing. $\times 16,000$)

Fig. 3. The sections of bacterial cells from an old culture, showing dense parts within cells. ($\times 18,000$)

Fig. 4. The sediment after centrifugation at 26,000 g for 60 min. (Cr shadowing. $\times 18,000$)

Fig. 5. The sediment after centrifugation at 57,000 g for 60 min. (Cr shadowing. $\times 22,000$)

Fig. 6. The purified *P. solanacearum* virus strain A (strain S₁) particles.
(Cr shadowing. ×28,000)

Fig. 7. The virus particles adsorbed on the surface of bacteria.

Fig. 8. The protoplasm of lysed bacteria by the virus.
(Cr shadowing. ×11,000)

Fig. 9. Bacterial cells lysed by the virus and liberated virus particles. The flagella still attached to the lysed bacterial cells. (Cr shadowing. ×15,000)

Fig. 10. The lysis of bacteria by the virus. (Cr shadowing. ×16,000)

Lab. of Plant Pathology,
Fac. of Agriculture,
Kyushu University,
Fukuoka, Japan

第6及び第7図版説明

(電子顕微鏡写真)

Fig. 1. 8時間培養菌 (クロム・シャドイング. ×16,000)

Fig. 2. 48時間培養菌 (クロム・シャドイング. ×16,000)

Fig. 3. 48時間培養菌の内部構造 (×18,000)

Fig. 4. 遠心分離(2)の沈澱 (クロム・シャドイング. ×18,000)

Fig. 5. 遠心分離(3)の沈澱 (クロム・シャドイング. ×22,000)

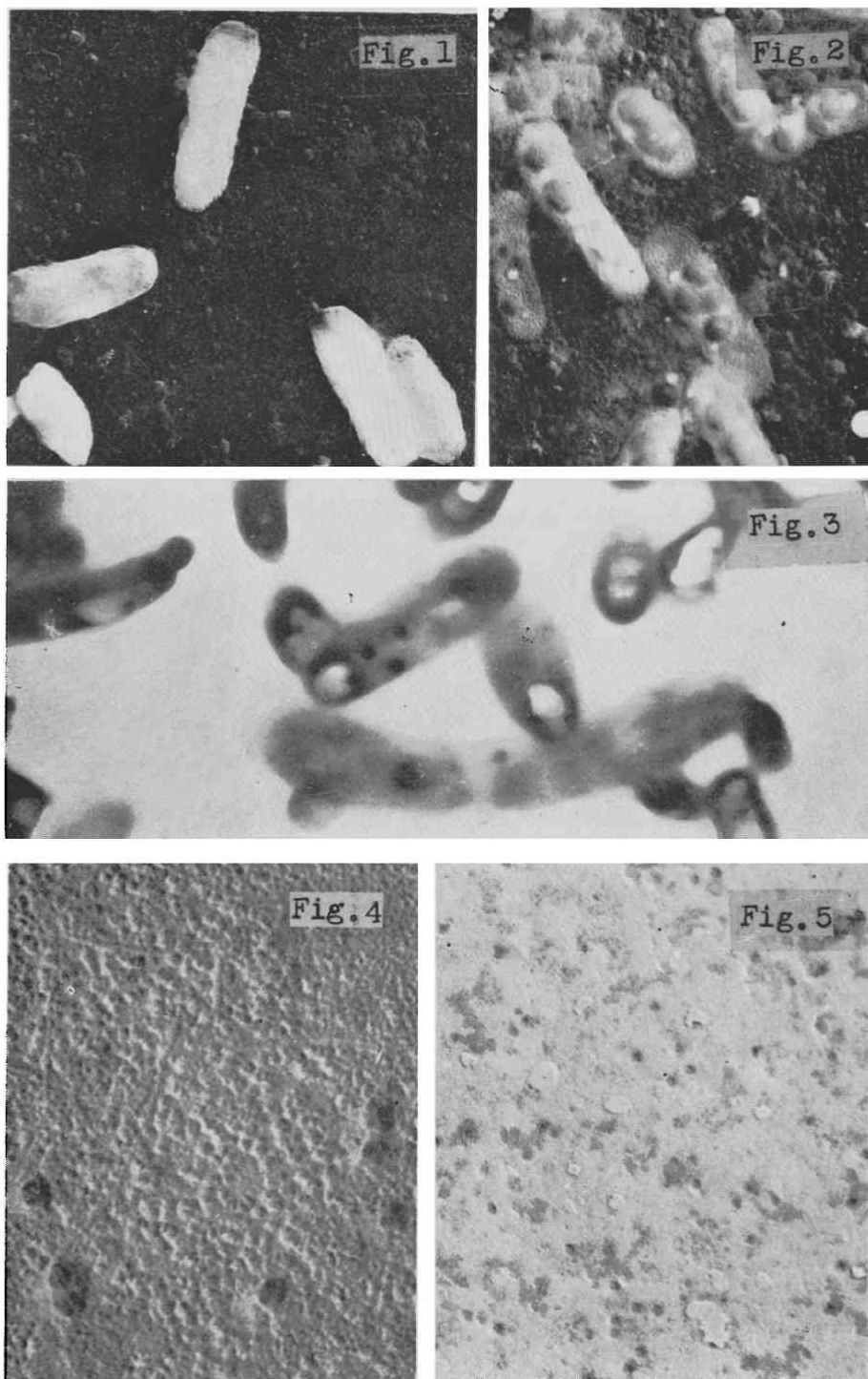
Fig. 6. 精製ウイルス粒子 (クロム・シャドイング. ×28,000)

Fig. 7. 宿主菌体に吸着したウイルス粒子 (×17,000)

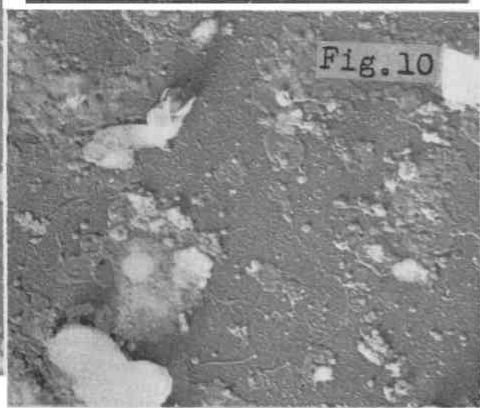
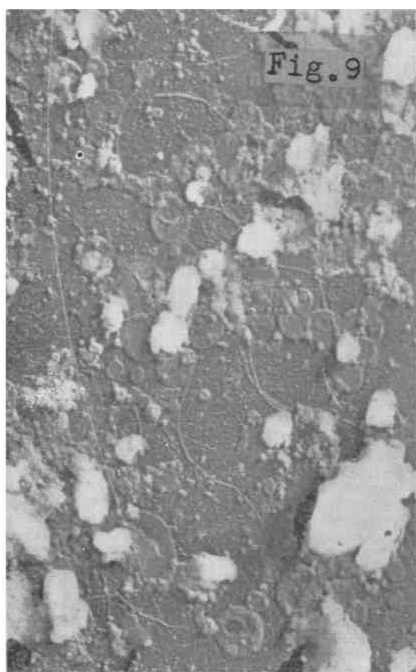
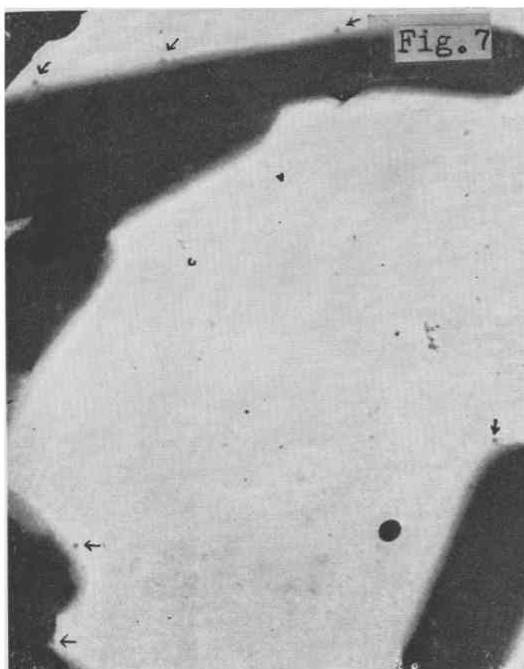
Fig. 8. 溶菌 (クロム・シャドイング. ×11,000)

Fig. 9. 溶菌 (クロム・シャドイング. ×15,000)

Fig. 10. 溶菌 (クロム・シャドイング. ×16,000)



Rseudomonas solanacearum ウイルスの電子顕微鏡写真



Pseudomonas solanacearum ウイルスの電子顕微鏡写真