

Streptomyces coeruleusのフージ尾部様粒子の 産生を伴ったPock形成現象

末永, 光
九州大学農学部発酵学教室

緒方, 靖哉
九州大学農学部発酵学教室

林田, 晋策
九州大学農学部発酵学教室

<https://doi.org/10.15017/22160>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 39 (1), pp.27-33, 1984-07. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

Streptomyces coerulescens のファージ尾部様粒子 の産生を伴った Pock 形成現象

末 永 光・緒方靖哉・林田晋策
九州大学農学部発酵学教室
(1984年4月9日 受理)

Pock Formation of *Streptomyces coerulescens* with Production of Phage Tail-like Particles

HIKARU SUENAGA, SEIYA OGATA*
and SHINSAKU HAYASHIDA

Laboratory of Applied Microbiology, Department of Agricultural
Chemistry, Kyushu University 46-02, Higashi-Ku, Fukuoka 812

緒 言

抗生物質生産性を有する放線菌の中には、固体培地上にファージのプラークに類似した溶菌斑 (或は生育阻止環) を生じながら菌叢を形成する現象が認められる。溶菌斑の数は菌体を新しい培地に移植するごとに増加し、それらの菌叢は最終的には、気中菌糸の生育の悪い、孢子着生のないものとなる。溶菌斑が多数生じているスラントを用いて抗生物質の生産を進めると、菌糸の生育は遅延し、生成物の生産低下につながる。また、継代による菌株保存に当っては、著しく活力の衰退した菌株や性状の変化した菌株を残してしまうことになる。著者らはこれまでに thiostrepton 生産性の *Streptomyces azureus* (ATCC 14921) (S. Ogata *et al.*, 1981) と endomycin 生産性の *Streptomyces endus* (KCC S-0213) (S. Ogata *et al.*, 1982) の溶菌斑形成現象について報告してきたが、これらと類似の現象が、*Streptomyces coelicolor* (M. J. Bibb *et al.*, 1978; D. A. Hopwood *et al.*, 1973) や *Streptomyces lividans* (C. J. Thompson *et al.*, 1980) 等の菌株でも報告されており、プラスミドの移行に伴う接合致死現象或いは“pocks”現象と呼ばれている。Pock とは性因子をもつ donor 菌株と recipient 菌株とが接触して生育するとき、donor 菌株のコロニーのまわりに形成される recipient 菌株の孢子形成が阻害されたことを示す円形のゾーンを指

す。*S. azureus* や *S. endus* の溶菌斑形成現象と *S. coelicolor*, *S. lividans* の“pocks”現象との関係はまだ明らかでないが、*S. azureus* や *S. endus* の菌叢中に形成される溶菌斑の形状が pock の形状と類似していること、また、外来性ファージの作る本来のプラークと区別して表現する必要があるので、本報告では *S. azureus*, *S. endus* の溶菌斑も pock と呼ぶことにした。ただ、*S. azureus*, *S. endus* の pock 形成の際にみられるファージやファージ尾部様粒子の産生は、*S. coelicolor* や *S. lividans* の“pock”現象では報告されていない。本報では、cerulomycin 生産性の *Streptomyces coerulescens* (KCC S-0360) にも pock 形成を認めたので、pock の形状およびファージ尾部様粒子の産生の有無などを、先の *S. azureus* や *S. endus* の場合と比較しながら検討した結果を報告する。*S. coerulescens* は *S. azureus* と同じく青色群に属し、灰色群である *S. endus* とは分類学的に異なる。

実 験 方 法

1. 使用菌株

本実験には、主として、*Streptomyces coerulescens* (KCC S-0360) を使用した。その他 pock 抽出液中の *Streptomyces* 属細菌に対する感受性物質の検索には科研薬品東京研究所の清野昭雄博士より分譲いただいた約 50 株の *Streptomyces* 属細菌を使用した。

2. 培地と培養条件

Bennett 液体培地 及び 固体培地 (B培地: グルコ

* 別刷請求先

ース1%, 肉エキス0.1%, 酵母エキス0.1%, NZ-amine type A 0.2%, pH 7.2, 寒天1.5%) 或は Rye flakes 寒天培地 (R培地: rye flakes 1%, グルコース0.2%, 酵母エキス0.1%, CaCO_3 0.2%, pH 7.2, 寒天1.5%) を菌の培養や pock 形成に使用した。R培地は気菌糸の生産や胞子形成に適していた。培養は全て 28°C, 好気条件下で行なつた。重層寒天培養の際にはB培地を用い、上層寒天の濃度は0.6%, 下層のそれは1.5%とした。

3. 胞子懸濁液の調整

R培地上に着生した胞子をかき集め、B培地に懸濁した。胞子鎖は Insonator (Model 200 M 久保田製) で崩し、残存する胞子鎖及び菌糸体はろ紙(東洋ろ紙2)で繰り返して過することによつて除き、胞子懸濁液を調整した。

4. 単コロニーの分離と培養

胞子液を希釈して、ペトリ皿当たり約50個のコロニーが生じるようにした。1,000個の正常コロニーを分離し、4 ml のR培地が入ったバイアル(サイズ: 27×55 mm, 容量: 20 ml) に1個ずつ移植した。生育したコロニーは同様にバイアルを使用して、培養7日目ごとに継代した。

5. Pock 抽出液の調整

Pock 抽出液の調整はファージの semi confluent-plate lysis 法に従つた (A. Eisenstark, 1967)。pock の多数生じたプレートに、5 ml の 1/20 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) やアンモニア-酢酸緩衝液 (pH 6.0) を加え、約5時間室温に置いた後、この抽出液を遠心して、その上清を回収した。また、メンブランフィルター (0.45 μm) によるろ過も遠心後に併用した。

6. Cross-brush test

この方法は pock を有する異常コロニーの感染能を検出するために用いた。Pock を生じていない正常コロニー由来の胞子液をR平板培地上に白金耳を用いて塗抹し、さらに、これと一部重なるようにして pock の生じた異常コロニー由来の胞子液を塗抹した。これを 28°C で培養し、pock の生じた異常コロニーが示す正常コロニーに対する生育阻止能の有無を検した。

7. Stamp test

この方法は pock の感染能を検するために用いた。R平板培地に正常コロニー由来の胞子液を白金耳を用いて予め塗抹しておき、その上に1個の pock を白金耳を用いて釣りあげスタンプした。これを、28°C で培養し、スタンプした個所に表われる正常菌叢に対す

る生育阻止の有無を検した。

8. Spot test

この方法は上記の pock 抽出液中のファージ溶菌因子或は生育阻止因子の検索に用いた。これらの活性の測定は重層寒天培地上で行なうバクテリオシンの力価測定法に従つた (F. Jacob et al, 1959)。Pock の抽出液を倍数希釈し、これらの液を、*S. coerulescens* の正常コロニー由来の胞子やその他の 39 菌株の *Streptomyces* 属の放線菌の胞子を予め接種しておいた重層寒天培地上にスポットし、培養後に表われるスポット個所の生育阻止の有無を検した。

9. 液体培養

液体培養は次のようにして行なつた。*S. coerulescens* の正常スラントより得た胞子或は正常スラントと pock を有するスラントから得た混合胞子をメンブランフィルター (0.45 μm) 上で洗浄し、ろ過性物質を除去した後、これら胞子を B液体培地に懸濁し、28°C, ローター振とう機にて培養した。

10. コロニーの写真

コロニーおよび菌叢の写真は、富士フィルム F を用いたニコン F E カメラ (日本光学工業) により撮影した。

11. 電子顕微鏡写真

電子顕微鏡写真は JEM 100 B 型電子顕微鏡 (日本電子工業株式会社) を用い、ネガティブ染色法に従つて撮影した。アンモニア-酢酸緩衝液 (pH 6.0) で抽出した抽出液を 2% リンタングステン酸ナトリウム液 (pH 6.0) を用い、ネガティブ染色し、コロジオン-炭素によつてコートしたグリッド上においた。また、pock を白金耳で釣り上げ、直接燐タングステン酸ナトリウム液中に懸濁した試料および液体培養の上清から超遠心或は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沈殿法により得た沈殿物を緩衝液に懸濁した試料についても観察した。

結 果

1. コロニーの形態

Streptomyces coerulescens は Fig. 1 に示すように固体培地上にファージのプラークに類似した pock と呼ばれる生育阻止環を形成した。Pock 中の胞子の形成及び気中菌糸の増殖は阻害されていたが、基底菌糸は生育しているように認められた。単一コロニーの継代培養の間に生じるコロニーは、Fig. 2 に示すように形態的に3種 (A, B, C) に分類できた。数個の pock を有する B 1コロニーは pock のない正常な A型コロニーから生じた。B型コロニー中の pock 数

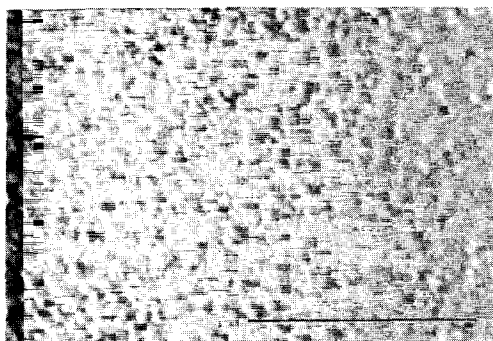


Fig. 1. Spontaneous appearance of pocks in confluent lawns of *Streptomyces coeruleus*. Bar, 1 cm.

は、継代培養を繰り返すごとに増加し、最終的には気中菌糸及び孢子着生菌糸が生育していない、基底菌糸のみが生育するC型コロニーになった。Fig. 3はバイアル中で継代培養時にみられた pock を生じたコロニー（異常コロニー）の出現率を示している。*S. coeruleus* における pock を発生した異常コロニーの出現率は *S. azureus* よりも高く (*S. Ogata et al.* 1981), *S. endus* と類似しており, (*S. Ogata et al.* 1982), 4回以内の継代培養で、使用した約1,000個のコロニーのすべてに pock が生じた。これらの結果はまた、pock の形成は自然誘発的であることと、さらに、全ての孢子が pock 形成能を遺伝的に有していることをも示している。

2. Pock の伝播力

上記のB型コロニーとC型コロニーに存する pock 形成伝播能を cross-brush test や stamp test によって検した。Fig. 4Aに示すように、C型コロニーは pock のない正常なA型コロニーの生育を阻害した。Fig. 4Bに示すようにA型コロニーのスタンプ個所には気中菌糸の生育阻害が認められた。また、semi-

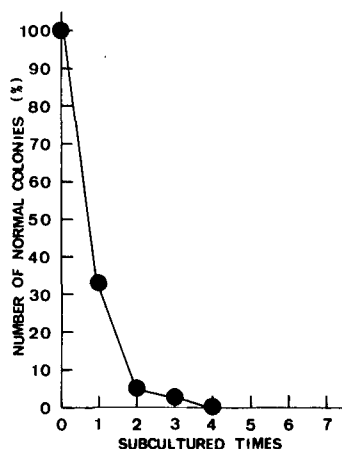


Fig. 3. Loss of normal colonies and appearance of pock-carrying colonies during serial subculturing. The cultures were started from 1,000 colonies.

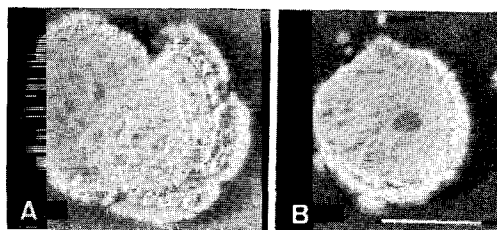


Fig. 4. Infectious activity of pock. A shows the result of cross-brush test. B shows the result of stamp test. Bar, 1 cm.

confluent plate lysis 法によって得られた抽出液をろ過し、これを希釈して pock のない正常なコロニー由来の孢子を接種した重層寒天上にスポットしたが、pock の形成及び生育阻害作用は認められなかった。従つて、*S. endus* と同様 *S. coeruleus* にも *S. azureus* とは異なり pock 中に自己増殖性の感染因子

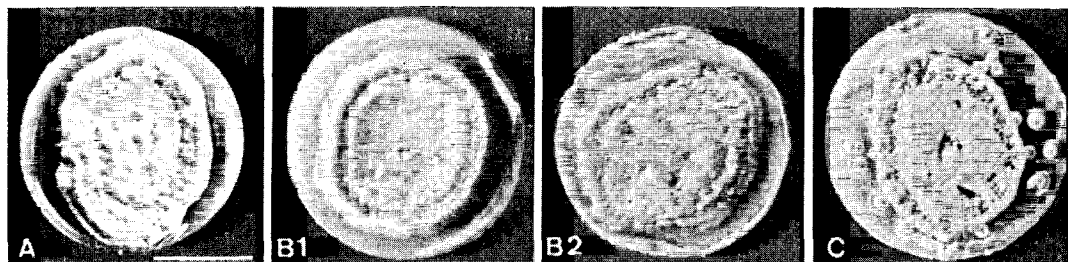


Fig. 2. Various colonies which appeared during serial subculturing. A, normal colony; B and C, abnormal colonies. A type colony is rich in aerial mycelia and spores. B1 type colony has a few pocks. B2 type colony has overlapping pocks. C type colony shows semiconfluent lysis and has a few aerial mycelia and no spores. Bar, 1 cm.

が存在しないと考えられた。また、この pock 抽出液を用いて *Streptomyces* 属のタイプ菌種 39 菌株に対して同様な spot test を行なったが、*S. azureus*, *S. caelestis*, *S. bellus*, *S. coeruleorubidus*, *S. caracoi*, *S. cyaneus*, *S. glaucescens*, *S. viridochromogenes* の 5 菌株、*S. griseus* 10 菌株、*S. lavendulae* 9 菌株、*S. venezuelae*, *S. virginiae*, *S. purpurascens*, *S. fradiae*, *S. albus*, *S. rimosus*, *S. achromogenes*, *S. albogriseolus*, *S. ambofaciens*, *S. aureofaciens*, *S. griseoluteus*, *S. humidus*, *S. olivaceus*, *S. rochei*, *S.*

aureus に対しては pock 形成及び生育阻害作用は認められなかった。しかし、*S. griseus* (KCC S-0047), *S. niveus* (KCC S-0251), *S. griseus* subsp. *streptomycini* (KCC S-0320), *S. humifer* (KCC S-0770) に対して弱い生育阻害を示した。これらの生育阻害はバクテリオシン様の作用か溶菌酵素の作用に起因すると考えられ、詳細は現在検討中である。

3. 電子顕微鏡観察

Pock 中の菌糸はほとんどすべて溶解していることが電子顕微鏡的観察で明らかになった。また、Fig. 5

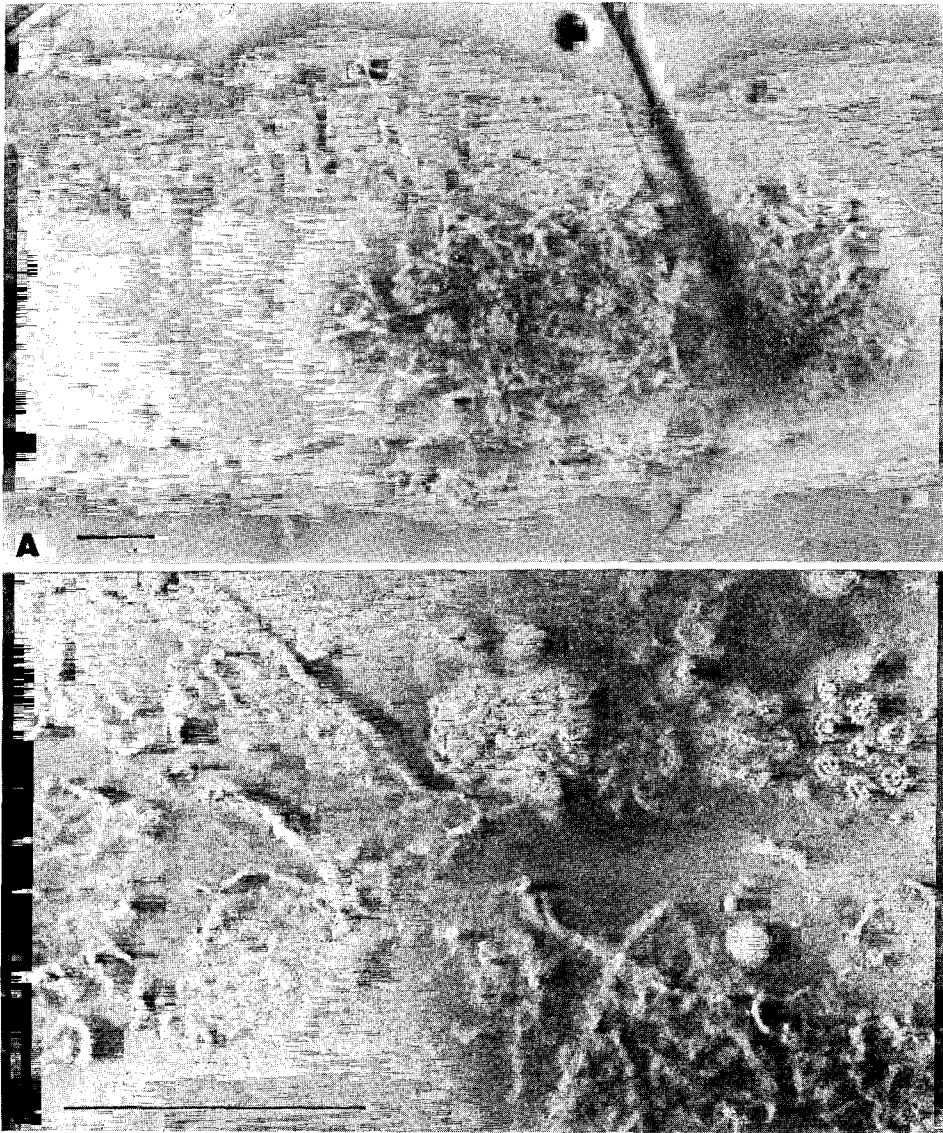


Fig. 5. Electron micrographs of broken hyphae of *Streptomyces coeruleus*. There are some phage tail-like particles on the broken hyphae (A) or around them (B). Bar, 200 nm.

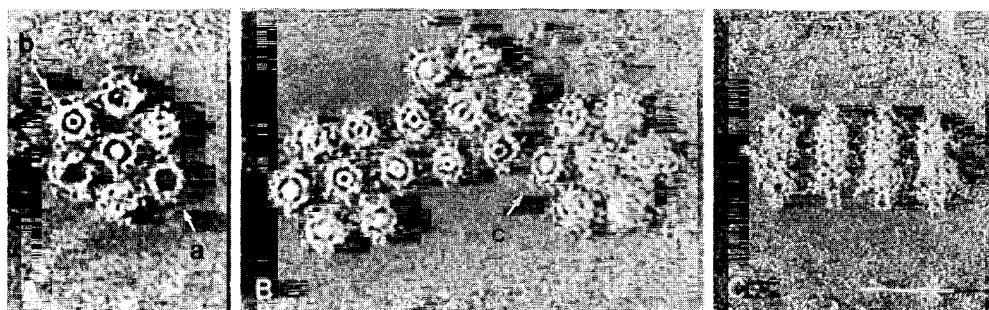


Fig. 6. Electron micrographs of hexagonal crystal and bullet shape of phage tail-like particles. Bar, 50 nm.

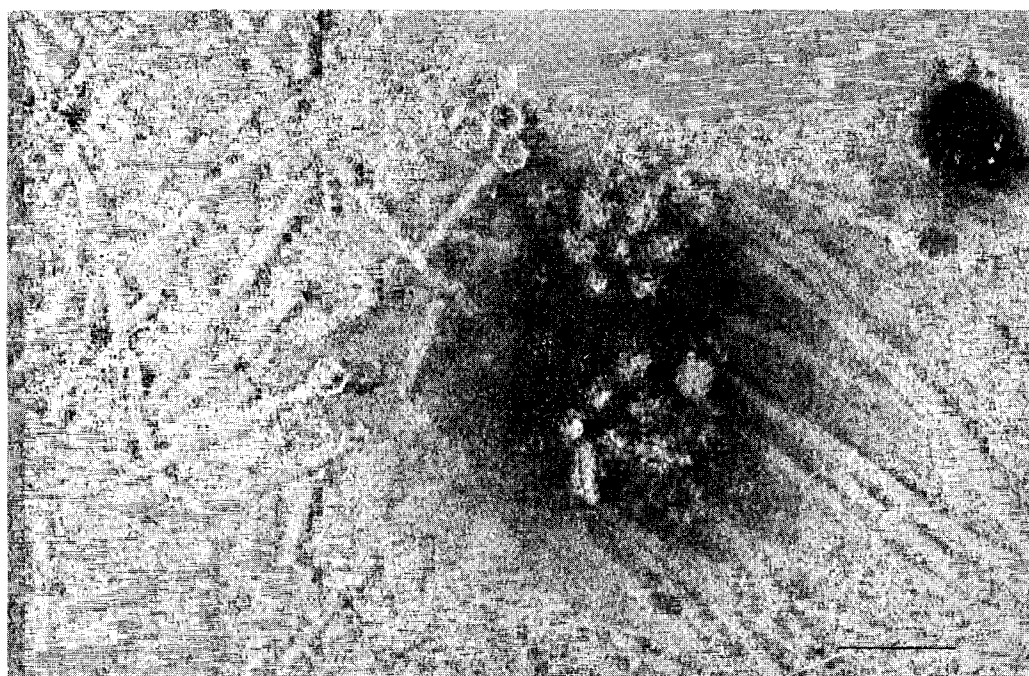


Fig. 7. Electron micrographs of long phage tail-like particles. Bar, 50 nm.

に示すように溶解した菌糸の内部や周囲にはファージの尾部先端構成成分に類似する粒子が多数存在し、結晶構造を成していた。Fig. 6 A, 6 B, に示すように1個の六角状の結晶は7個の基本粒子から成っていた。大部分の粒子が底面側（或は上面側）からみた構造をとっているが、Fig. 6 C に示すような側面からみた構造のものも存在した。基本粒子の長さは約 50 nm で径は 18 nm であった。これらの粒子の構造や大きさは、*S. azureus* や *S. endus* の pock 形成の際に生成される粒子と非常に良く類似していた (S. Ogata *et al.* 1981; S. Ogata *et al.* 1982)。また、Fig. 7 に示すように *S. azureus* で観察されたような長いファー

ジ尾部様粒子も存在していた (S. Ogata *et al.* 1981)。なお、これらの長尾部粒子は *S. endus* では存在しなかった。

4. 液体培養下でのファージ尾部様粒子の産生性

以下の実験により液体培養及び若いプレート培養中のファージ尾部様粒子の産生性について検討した。Pock を生じているスラントより集めた胞子と pock のない正常なスラントより得た混合胞子をメンブランフィルター (0.45 μm) 上で洗浄して、ろ過性物質を除去した後、これらの胞子を B 液体培地に懸濁し、28°C、好気条件下で 1~4 日間培養した。この培養液を遠心、ろ過し、菌体を除き、ろ液について電子顕微

Table 1. Production of phage tail tip-like particles and formation of pock in liquid or solid culture

Samples	Formation of pock	Production of particles ^c
1-day' liquid culture ^a	—	—
2-days' liquid culture ^a	—	—
4-days' liquid culture ^a	—	—
1-day's solid culture ^b	—	—
2-days' solid culture ^b	—	—
4-days' solid culture ^b	+	+
8-days' solid culture ^b	+	+

+: Formation or production,

—: No formation or production

^aSupernatant of liquid culture, and ^bbuffer-extract from solid culture were used for detection of particles.

^cDetected by electron microscope.

鏡によりファージ尾部様粒子の検索を行なった。他方、これらの胞子を、プレート培地上に白金耳で塗抹し、28°C 好気条件下で1~8日間培養した。次にこれらのプレートに緩衝液を加え、抽出を行ない、この抽出液について電子顕微鏡によりファージ尾部様粒子を検索した。Table 1 に示すように液体培養下ではファージ尾部様粒子の産生は起こらなかった。また、気中菌糸や胞子着生菌糸の生育がほとんどないプレート培養の初期にもファージ尾部様粒子の産生は認められなかった。しかし、pock 形成が明瞭になったプレート培養中にはファージ尾部様粒子の産生が認められた。これらの結果よりファージ尾部様粒子の産生は、気中菌糸及び胞子着生菌糸の存在する場合に起こるものと考えられた。

以上の結果をもとにして pock の生じた菌叢を pock のない正常な菌叢に一時的に回復させることができた。すなわち、pock の生じた異常コロニー（或はスラント）の胞子や菌糸をB液体培地で24時間以上振とう培養し、増殖してきた菌糸（大きな菌塊は除く）を固体培地に移植することにより、気中菌糸や胞子着生菌糸の増殖が良好な正常菌叢を得た。しかし、これを固体培地上で再び継代培養するとまた pock が生じるようになった。この *S. coerulescens* の液体培養による pock のない正常な菌への一時的な回復も、*S. azureus* や *S. endus* の場合と同様であった（S. Ogata et al. 1981; S. Ogata et al. 1982）。

考 察

S. coerulescens の pock 中には、*S. azureus* や *S. endus* の場合と同様にファージ尾部先端構造に類似した粒子が多数存在していたが、これらの粒子は *S. azureus* と *S. endus* の粒子に形や大きさでも非常に良く類似していた（S. Ogata et al. 1981; S. Ogata et al. 1982）。また、*S. coerulescens* の pock 中には、*S. endus* では認められなかった長いファージ尾部様粒子が *S. azureus* と同様に存在していた（S. Ogata et al. 1981; S. Ogata et al. 1982）。しかし、*S. azureus* で極少数存在する whole ファージ（S. Ogata et al. 1981）は *S. endus* の場合と同様に *S. coerulescens* にも認められなかった。これら3菌株の pock 形成はいずれもすべて増殖能のない欠損ファージであるファージ尾部様粒子の産生に伴う溶菌に起因すると考えられる。また、これらの3菌株の pock 形成現象には、ファージ尾部様粒子の産生が、気中菌糸や胞子着生菌糸の生育が不十分な固体培養の培養初期や液体培養では起こらないが、これらの菌糸が生育している固体培養では起こること、pock を有する菌叢を一度液体培養を経過させることによつて、pock のない菌叢へ一時的に回復させることができることなどにも共通点が認められる。これらの結果は本 pock 形成現象が気中菌糸や胞子着生菌糸で起こる現象であることを示している。本現象の機構の解明は現在続けている。

要 約

1. 抗生物質 cerulomycin 生産性の *Streptomyces coerulescens* (KCC S-0360) は外来性ファージの感染によらず内的要因によつて固体培地上に継代培養ごとに数が増大する pock を生じながら菌叢を形成した。
2. Pock 中の大部分の気中菌糸及び胞子着生菌糸は溶菌していた。
3. Pock 中には、ファージの尾部先端構成成分に類似した粒子が、溶解した菌糸の周囲や内部に多数存在していた。
4. 気中菌糸と胞子着生菌糸の溶解とファージ尾部様粒子の存在は、これまで報告してきた thiostrepton 生産性の *Streptomyces azureus* (ATCC 14921) と endomycin 生産性の *Streptomyces endus* (KCC S-0213) の pock 形成現象と非常によく類似していた。

文 献

- Bibb, M. J., J. W. Ward and D. A. Hopwood
1978 Transformation of plasmid DNA into
Streptomyces at high frequency. *Nature*,
274: 398-400
- Eisenstark, A. 1967 Bacteriophage techniques.
In "Methods in Virology," Vol. 1, ed. by
K. Maramorosch and H. Koprowski, Academic
Press, Inc., New York and London, pp.
449-524
- Hopwood, D. A., K. F. Chater, J. E. Dowling
and A. Vivian 1973 Advances in *Streptomyces*
coelicolor genetics. *Bacteriol. Rev.*, 37:
371-405
- Jacob, F. and E. L. Wollman 1959 "Bacterio-
phages," ed. by M. H. Adams, Wiley (Inter-
science), New York, pp. 381
- Ogata, S., S. Yoshino, H. Suenaga, H. Aoya-
ma, N. Kitajima and S. Hayashida 1981
Specific lysogenicity in *Streptomyces azureus*.
Appl. Environ. Microbiol. 42: 135-141
- Ogata, S., H. Suenaga and S. Hayashida 1982
Pock formation of *Streptomyces endus* with
production of phage tail-like particles. *Appl.*
Environ. Microbiol. 43: 1182-1187
- Pridham, L. G. and H. D. Tresner 1974 *Streptomyces*
Waksman and Henrici 1943, 339. In
"Bergeys Manual of Determinative Bacterio-
logy," ed. by R. E. Buchanan and N. F.
Gibbons, The Williams and Wilkins Com-
pany, Baltimore, pp. 748-881
- Thompson, C. T., J. M. Ward and D. A. Hop-
wood 1980 DNA cloning in *Streptomyces*:
resistance genes from antibiotic-producing
species. *Nature* 286: 525-527

Summary

Plate (or slope) cultures of cerulomycin-producing *Streptomyces coeruleus* (KCC S-0360) showed spontaneously developing pocks which increased in number during subculturing. No spore formation and reduced aerial hyphae formation were observed in the pocks, whereas the formation of substrate hyphae were not inhibited. Almost all of the hyphae were broken or lysed in the pocks, and many phage tail-like particles, containing long tail type and bullet-shaped type, were observed in the pocks. The bullet-shaped particles often formed a hexagonal crystal. No activity of self-replication was associated with the particles. The production of these particles did not occur in the liquid culture and the young or normal plate culture having no pocks. These results were similar to those of thiostrepton-producing *Streptomyces azureus* (ATCC 14921) and endomycin-producing *Streptomyces endus* (KCC S-0213), which have been described previously.