

2) 温度感受性耐性因子に関する研究

温度感受性 KM 耐性因子と fi^- の非温度感受性耐性因子の重感染

金丸 佳郎;

横田 健

はじめに

1966年寺脇⁽¹⁾によって発見された温度感受性KM耐性因子 Rts1 [R(KM)]⁽²⁾ について著者は遺伝学的検討を加え、今日までに Rts1 は fi^- 型に属し、 fi^+ 型の4剤耐性因子 R₁₀₀ (CM, TC, SM, SA) と同一宿主菌に重感染する時は干渉を示さず⁽²⁾、25°C~37°Cにおいて両者は安定に共存し、この場合にそれぞれの温度感受性度に影響はないが、ある条件下では、両者の recombinants が高率に撰択され、その大部分は温度感受性であり、さらに、これから新しい温度感受性R因子が segregate すること⁽³⁾、又 Rts1 因子は fi^- であるが、すべての T-even phages を restrict し、phage λ に対しては restriction を示さないことから⁽⁴⁾⁽⁵⁾、第3グループのR因子と思われるなどを発表した⁽⁶⁾。今回は温度感受性 KM 耐性因子 Rts1 と、 fi^- の非温度感受性 NR73、および NR75-1 因子との共存状態を検討したので報告したい。

材料および方法

1) 材料

① 実験微生物

E. coli YA5 (W3630: Rts1),

E. coli YA10 (58-161: F⁺),

E. coli YA11 (58-161: Rts1),

E. coli YA27 (CSH2: Rts1),

E. coli YA31 (W3630: NR73),

E. coli YA32 (W3630: NR75-1),

E. coli YA33 (W3630: Rts1; NR73),

E. coli YA34 (W3630: Rts1; NR75-1),

E. coli W3110, *E. coli* CSH2

E. coli YA13 (W3630: Rts2)

② 使用培地

Lederberg の EMS 寒天培地⁽⁷⁾, Mac Conkey寒天培地, Penassay broth

③ 薬剤

kanamycin (硫酸塩: 武田薬品工業K.K)

streptomycin (硫酸塩: 武田薬品工業K.K)

chloramphenicol (山ノ内製薬K.K)

tetracycline (Aureo. powder; 日本レダリーK.K)

sulfonamide (山ノ内製薬)

PenicillinG (明治製薬)

2) 方法

イ) *E. coli* CSH2: R⁻, *E. coli* YA27, *E. coli* YA10 および *E. coli* YA11 を recipients とし *E. coli* YA31 又は, *E. coli* YA32 を donor として相互伝達実験を 25°C, 37°C および 43°C において行った⁽⁸⁾。R⁻菌に対するこれらのR因子の伝達頻度を調べれば、この方法により、Rts1 の存在が fi^- のR因子、すなわち NR73、又は NR75-1 の重感染にどのような効果を示すか同時に調べることが出来る。

ロ) *E. coli* YA33、又は *E. coli* YA34 がイ)のこれを pure clone とし、薬剤を含まない Penassay broth 中に、25°C 18hours 静置培養する。これに 50 μ g/ml の KM, 10 μ g/ml の TC を加えさらに 18 hours 43°C に保温した。MacConkey 平板上にこれらの菌を 37°C 24 hours 画線培養し生じた colony の耐性パターンを replica 法で調べた。種々の耐性パターンを示すものについて 25°C、および 43°C でそれぞれの耐性マーカーの脱落実験を行った⁽³⁾。

ハ) 上記方法で recombinants が選出出来ない場合、Penicillin Screening を利用し、*E. coli* W3630 で Rts1, NR73 両方をもつもの (YA33) を 25°C, 18 hours 培養したのち、下記の如き薬剤の色々な組合せを加え、

| | | | |
|-----------|---|----|-----------------------------------|
| Test tube | 1 | KM | 50 μ g/ml |
| | 2 | TC | 5 μ g/ml |
| | 3 | SM | 25 μ g/ml |
| | 4 | SA | 1000 μ g/ml |
| | 5 | TC | 5 μ g/ml, SM 25 μ g/ml |
| | 6 | TC | 5 μ g/ml, SA 1000 μ g/ml |
| | 7 | SM | 25 μ g/ml, SA 1000 μ g/ml |

さらに 25°C で 30分振盪培養した。その後 PenicillinG 100 u/ml を加え、振盪培養を続け、4 hours、および 24 hours 後に薬剤を含まない Mac Conkey 平板上に画線し、得られた生残菌の耐性パターンを replica 法で調べた。

ニ) 若し、Rts1 と NR73 の recombinant をもつと考えられる clone が得られたなら、25°C, 37°C および 43°C で R⁻菌に対する伝達実験を行ない、co-transfer の可能性を検討した。

実験成績

イ) Rts1 因子は fi^+ 型R因子とは干渉を示さないが、

Table 1 MUTUAL TRANSFER OF THE THERMOSENSITIVE Rts1 AND fi^- NON-THERMOSENSITIVE NR73 (TC, SM, SA) FACTORS.

| Cultured microbes | Culture temperatures | | | Transfer frequencies | |
|----------------------|----------------------|--------|---------|------------------------|----------------------|
| | Subcult. | Mixed. | Select. | Rts1 | NR73 |
| CSH2:Rts1 | 25 | 25 | 37 | 7.3×10^{-4} | — |
| + | 37 | 37 | 37 | 3.3×10^{-5} | — |
| W3630:R ⁻ | 43 | 43 | 37 | 3.3×10^{-6} | — |
| CSH2:Rts1 | 25 | 25 | 37 | 8.1×10^{-5} | 1.1×10^{-5} |
| + | 37 | 37 | 37 | $< 3.7 \times 10^{-7}$ | 1.5×10^{-1} |
| W3630:NR73 | 43 | 43 | 37 | $< 10^{-8}$ | 7.3×10^{-3} |
| CSH2:R ⁻ | 25 | 25 | 37 | — | 4.2×10^{-6} |
| + | 37 | 37 | 37 | — | 3.2×10^{-2} |
| W3630:NR73 | 43 | 43 | 37 | — | 3.2×10^{-3} |

Table 2 MUTUAL TRANSFER OF THE THERMOSENSITIVE Rts1 AND fi^- NON-THERMOSENSITIVE NR75-1 (SM) FACTORS.

| Cultured microbes | Culture temperatures | | | Transfer frequencies | |
|----------------------|----------------------|-------|---------|----------------------|----------------------|
| | Subcult. | Mixed | Select. | Rts1 | NR73 |
| CSH2:Rts1 | 25 | 25 | 37 | 7.3×10^{-4} | — |
| + | 37 | 37 | 37 | 3.3×10^{-5} | — |
| W3630:R ⁻ | 43 | 43 | 37 | 3.3×10^{-6} | — |
| CSH2:Rts1 | 25 | 25 | 37 | 9.5×10^{-5} | 6.5×10^{-4} |
| + | 37 | 37 | 37 | 2.7×10^{-7} | 2.5×10^{-2} |
| W3630:NR75-1 | 43 | 43 | 37 | 10^{-8} | 3.0×10^{-3} |
| CSH2:R ⁻ | 25 | 25 | 37 | — | 3.1×10^{-4} |
| + | 37 | 37 | 37 | — | 5.3×10^{-2} |
| W3630:NR75-1 | 43 | 43 | 37 | — | 4.3×10^{-3} |

Table 3 STABILITY OF THERMOSENSITIVE Rts1 AND NON-THERMOSENSITIVE, fi^- NR73 OR NR75-1 IN *E. COLI* W3630 INHERITING THE BOTH R FACTORS

| Strains tested | Culture temperature | Elimination frequencies (%) | |
|-------------------|---------------------|-----------------------------|----------------|
| | | Rts1 | NR73 or NR75-1 |
| W3630:Rts1;NR73 | 25 | 0.07 | 0 |
| | 43 | 99.2 | 0.07 |
| W3630:Rts1;NR75-1 | 25 | 0.3 | 0 |
| | 43 | 08.5 | 0.5 |

fi^- 型の NR73 又は NR75-1 をもつ *E. coli* YA31, 又は *E. coli* YA32 に *E. coli* YA27 から Rts1 を伝達するとその伝達頻度は $1/10$ ないし $1/100$ に低下する。しかしその逆の場合 recipient に Rts1 をもっていても、もっていないとも NR73 又は NR75-1 の伝達頻度は変わらない、すなわち片側干渉である。

又、 fi^- R 因子の Rts1 に対する片側干渉は、Rts1 の donor として *E. coli* CSH2 のかわりに *E. coli* YA10 を使用してもみとめられる。以上の方法の相互伝達実験により *E. coli* で Rts1 と fi^- の NR73 又は NR75-1 の両方をもつ株が得られたが、この *E. coli* 細胞中では、これら R 因子は原則としておのおの独立して存在し、

43°C の高温培養により 3 表に見られるが如く Rts1 のみが高率に脱落する。

又、非常に低頻度であるが、相互排除が見られる。しかし一般の fi^- 型 R 因子間の相互排除にくらべ、Rts1 と NR73、又は NR75-1 の共存性ははるかに安定である。

ロ) *E. coli* YA33, *E. coli* YA34 の菌細胞中で Rts1 と fi^- 型 R 因子との recombinant を取る目的で薬剤含有 Penassay broth 中での高温培養を行ったが、すべての subclone が KM, SM, SA, TC 耐性で、Rts1 のもつ KM 耐性と NR73 のもつ SM, SA および TC 耐性又は NR75-1 のもつ SM 耐性すべてを保有し、両者の耐性マーカーの組合さったものは 1 つもみとめられなかった。(表 4)

さらにこれらの集落 30 ケを無作意に取り出し、25°C および 43°C 培養を行ない、各耐性マーカーの温度感受

性を調べたが、その結果は 43°C で KM 耐性のみが高率に脱落し、この方法によっては両者の recombinant は得られなかった。

ハ) そこで Penicillin screening を利用して recombinant をえらぶ努力をしたが表 5 に示す如く 4 時間の Penicillin Screening により得られた生残菌は計 700 個すべて KM, SM, SA, TC 耐性であり、しかも脱落実験により Rts1 のみが 43°C で高率に落ちることから、すべての菌が NR73 と Rts1 とを重感染したもので、recombinant の R をもつものはないと判定された。

Penicillin Screening 24 時間後の生残菌の耐性パターンは約 450 個の集落を調べ、その結果大部分が KM, SM, SA, TC 耐性であったが、わずかに 4 集落 KM, SM, SA 耐性であり、TC 耐性のないものが得られた。この TC 耐性のかけた Rts1 と NR73 の recombinant と想像

Table 4 SELECTION OF RECOMBINANTS BETWEEN THERMOSENSITIVE Rts1 AND fi^- NON-THERMOSENSITIVE NR73 OR NR75-1

| Strain employed | Culture conditions | | | Recovered colonies | | R-factor |
|-----------------------|--------------------|------|--------|--------------------------|----------|-------------|
| | Temp. | Time | Drugs | Resist. patterns | NO. | |
| W3630: Rts1;NR73 | 43 | 24 | None | KM. SM. SA. TC Others | 236 0 | Rts1;NR73 |
| | 43 | 24 | KM, TC | KM. SM. SA. TC Others | 173 0 | Rts;NR73 |
| W3630: Rts1;NR75-1 | 43 | 24 | None | KM. SM Others | 275 0 | Rts1;NR75-1 |
| | 43 | 24 | KM. TC | KM, SM Others | 77 0 | Rts1;NR75-1 |

Table 5 PENICILLIN SCREENING OF RECOMBINANTS BETWEEN THERMOSENSITIVE Rts1 AND NON-THERMOSENSITIVE fi^- NR73

| Screening condition | | | No. of colonies showing following resist. -patterns | R-factor | |
|---------------------|-------|------|---|----------|-------------------|
| Drugs | Temp. | Time | | | |
| KM, Pc | 25 | 4 | A11 KM. SM. SA. TC | 100 | Rts1;NR73 |
| | 25 | 24 | KM. SM. SA. TC SM. SA. TC | 30 2 | Rts1;NR73 NR73 |
| TC, Pc | 25 | 24 | KM. SM. SA. TC SM | 73 3 | Rts1;NR73 |
| SM, Pc | 25 | 24 | A11 KM. SM. SA. TC | 55 | Rts1;NR73 |
| SA. Pc | 25 | 24 | KM. SM. SA. TC | 11 | Rts1;NR73 |
| | | | KM. SM. SA SM | 2 3 | |
| TC. SM. Pc | 25 | 24 | A11 KM. SM. SA. TC | 71 | Rts1;NR73 |
| TC. SA. Pc | 25 | 24 | KM. SM. SA. TC | 98 | Rts1;NR73 |
| | | | KM. SM. SA | 2 | |
| SM. SA. Pc | 25 | 24 | A11 KM. SM. SA. TC | 55 | Rts1;NR73 |

Table 6 Temperature sensitivity of resistance markers in *E. coli* W3630 derivatives carrying an assumed recombinant between the *Rts1* and *NR73* factors

| Strain name or resistance pattern | Cult. temp. | Number of colonies tested | | | | | | R-factor |
|---|-------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------|
| | | Total | KM ^r | CM ^r | TC ^r | SM ^r | SA ^r | |
| W3630:Rts1;NR73 (KM, SM, SA) ^{r-1} ** | 25 | 50 | 50 | 0 | 0 | 50 | 50 | |
| | 43 | 50 | 50 | 0 | 0 | 50 | 0* | |
| W3630:Rts1;NR73 (KM, SM, SA) ^{r-2} ** | 25 | 50 | 50 | 0 | 0 | 50 | 7 | |
| | 43 | 50 | 50 | 0 | 0 | 50 | 0* | |
| W3630:Rts1;NR73 | 25 | 50 | 50 | 0 | 50 | 50 | 50 | Rts1;Nr73 |
| | 43 | 50 | 12 | 0 | 50 | 50 | 50 | |

* Resistance to sulfanamide in these strain seemed to be thermosensitively expressed or inherited

** Subclones of *E. coli* W3630 carrying both *Rts1* and *NR73* (YA33) obtained by penicillin screening with TC at 43°C (see Table 5)

Table 7 Transfer frequencies of each resistance marker from *E. coli* W3630 derivatives carrying *Rts2*, or an assumed recombinant between *Rts1* and *NR73*, at various temperatures.

| Cultured microbes | Cult. temp. | Transfer frequencies (KM ^r colonies/donor) |
|-------------------------|-------------|---|
| YA-13 (W3630:Rts2) + | 25 | 2.9×10^{-8} |
| | 37 | 1.0×10^{-6} |
| | 43 | 1.0×10^{-6} |
| W3630:KM. SM. SA + | 25 | 2.7×10^{-8} |
| | 37 | 5.7×10^{-2} |
| | 43 | 4.7×10^{-5} |
| W3110:R ⁻ | 43 | |

されるものについて、25°C および 43°C で R-factor の安定性を調べた結果は表 6 の如く、KM 耐性も 43°C の高温培養に対して安定で、しかも表 7 の如くその伝達頻度は 37°C が最高で、非温度感受性の recombinant と考えられることが既に得られている *Rts1* と *R₁₀₀* との温度感受性 recombinant である YA-13 の伝達実験と比較し明らかとなった。しかし 25°C で伝達したものは KM 耐性のみが安定であり、また、43°C で伝達したものは KM, SM, SA 耐性が安定であって、非温度感受性 recombinant であるか否か、即ち KM 耐性と SA, SM 耐性とが同一 Replicon 上に存在するか否かについては確認出来なかった。

考 察

Rts1 因子が *fi⁻* 型の非温度感受性 R 因子と片側干渉を示すことは興味深く、又、低頻度ではあるが相互排除が見られることは、*fi⁻* R 因子と *Rts1* との重感染の特長と考えられる。*Rts1* と *fi⁻* 型 R 因子両方もつ W3630 細胞中では、それら R 因子は原則として独立して replicate

し、お互いにそれぞれの温度感受性に影響を与えない事は、*Rts1* と *R₁₀₀* (*fi⁺*) の重感染の場合と同様である。*fi⁻* 型 R 因子と *Rts1* との間の recombination は *fi⁺* R 因子と *Rts1* との recombination にくらべはるかに起りにくい様に考えられ、又、recombinant と考えられるとしてもその結合は極めて不安定の様である。この点については更に検討したい。

本研究は昭和44年6月13日、14日に開催された第22回日本細菌学会関東支部例会に発表された。

引用文献

- 1) TERAWAKI, Y., H. TAKATSU, AND T. AKIBA. (1967); Thermosensitive replication of a kanamycin resistance factor. *J. Bacteriol.* 94: 687-690
- 2) 横田健, 有泉昇, 金丸佳郎, 森礼子 (1967): 温度感受性 R 因子に関する研究第 1 報 同一宿主菌細胞内に非温度感受性 R 因子と共存する時の態度. *日本細菌学雑誌* 22: 543

- 3) 横田健, 森礼子 (1968): 温度感受性 R(KM)⁺ 因子と, 温度感受性 R₁₀₀ (CM, TC, SM, SA) 因子との間に生ずる recombinants について, 日本細菌学雑誌23: 495
- 4) 山下豊子, 横田健 (1969): 温度感受性因子に関する研究第5報 T even phage に対する restriction 第22回日本細菌学会関東支部例会発表

- 5) 寺脇良郎, 吉川昌之介 (1969): Temperature sensitive Rfactor の感染による宿主菌の temperature sensitive growth の発現, 日本細菌学雑誌24: 142
- 6) 横田健, 森礼子 (1969): 温度感受性カナマクシン耐性因子と他の細胞質遺伝因子の関係, 第42回日本細菌学会総会発表
- 7) Lederberg, G, 1947, Genetics, 32: 247-267

3) 温度感受性耐性因子に関する研究

T even phage に対する restriction

横田 健, 山下 豊子

研究目的

寺脇ら⁽¹⁾により発見された温度感受性 Rts1 [R(KM)⁺ 因子] の遺伝学的諸性質を検討し, 現在すでに Rts1 因子は宿主菌の F 因子による染色体組み換えを阻害しない fi⁻ 型であり⁽²⁾, fi⁺ 型の 4 剤耐性因子 R₁₀₀ (CM, TC, SM, SA) と同一宿主菌に重感染する時は干渉を示さず, また同一宿主菌中に各々が独立して存在する時は, それぞれの温度感受性はお互いに影響を受けないが, 両者の間に生ずる recombinants は, 大部分温度感受性であり, かつ生じた recombinants は Rts1 と同じように phage T4b のみならず, すべての T even phages の E. O. P. を低下させることが知られた⁽³⁾. この Rts1 は指示菌として, *E. coli* W3630 を用いた場合のみならず, *E. coli* BS を用いた場合にも認められることを明らかにした⁽⁴⁾. 本報はこの Rts1 による T even phage の restriction が, 現在までに知られている fi⁻R 因子による λ あるいは P1KC に対する restriction と同じ機構⁽⁵⁾⁽⁶⁾ であるか検討を加えた結果を報告したい。

研究方法

(イ) *E. coli* W3630 : R⁻ を 37°C 18時間培養, それを新鮮 Penassay broth で10倍に稀釈して 37°C で更に 3時間振盪培養した。これに phage T2h, T4b, T4d, T6, P1KC を 10⁶ 程度加え, 37°C 1.5時間振盪後遠心分離し, 上清にクロロホルムを加え, これを phage 液とした。これらの phage の平板効率を (E. O. P.) *E. coli* W3630 : R⁻, W3630 : Rts1 (YA5), W3630 : Rts2 (YA13), W3630 : Rts3 (YA14), W3630 : Rts1 ; R₁₀₀ (YA6), W3630 : R₁₀₀ (JE948), W3630 : NR73 (YA31), W3630 :

NR73 ; Rts1 (YA33), W3630 : NR75-1 (YA32), W3630 : NR75-1 ; Rts1 (YA34) を指示菌として, 25°C, 37°C, 43°C において測定した。(ロ) *E. coli* BS strain にこれらの R 因子を transfer したのに対する T even phages の E. O. P. も同様に調べた。(ハ) P1KC の *E. coli* W3630 : R⁺ に対する E. O. P. を対照として測定した。(ニ) *E. coli* W3630 : R⁻, W3630 : Rts1, W3630 : Rts1 ; R₁₀₀ を 25°C で18時間培養, それを新鮮 Penassay broth で10倍に稀釈し, 25°C で6時間培養した後, 平板法で T even phages を増殖させた。密集した plaque のある平板の soft agar を 3 ml のペプトン水にとり, 遠心分離し, 上清にクロロホルムを加えた。この方法により W3630 : R⁻, W3630 : Rts1, W3630 : Rts1 ; R₁₀₀ の細胞中で増殖させた T even phage 液を作った。この phage 液をそれぞれの菌を指示菌として交叉的に 25°C, 37°C, 43°C における E. O. P. を調べた。(ホ) *E. coli* BS についても同様に測定した。(ヘ) *E. coli* BS : R⁻, BS : Rts1, BS : Rts1 ; R₁₀₀ を 25°C で18時間培養, それを新鮮 Penassay broth で100倍に稀釈し, 25°C で2時間振盪後, 約 1.0 × 10⁷ 個の T6 phage を加え, (即ち Moi 0.1~0.5) 25°C で30分振盪させた後すぐ冷却し, 4°C 10,000 rpm で10分遠心, それぞれの上清を稀釈し, 対数増殖期にある *E. coli* BS : R⁻ を指示菌として吸着率を測定した。沈では冷えた Penassay broth で1回洗浄し, 10 ml の Penassay broth に再浮遊させ, その 5 ml を稀釈して対数増殖期にある *E. coli* BS : R⁻ を指示菌として infective center を測定した。残りの 5 ml は 25°C で1.5時間振盪し, 冷却遠心後, 上清を *E. coli* BS : R⁻ を指示菌としてそれぞれの増殖の状態を測定した。

研究成績

表1の如く、Rts1はすべてのT even phagesのE. O. P.を25°Cにおいて強く抑制しており、fi⁺の4株耐性因子R₁₀₀はT even phagesを全然抑制しない。またRts1とR₁₀₀とが重感染したもの、あるいは両者のrecombinant⁽³⁾をもつ菌を指示菌とした場合にはRts1単独の場合と同様強い抑制が認められた。指示菌を37°C以上で培養するとほとんど抑制は解除された。E. coli BSによる抑制は表2の如く、25°CでのRts1および両者のrecombinantのT4bに対する抑制はみられたが、37°Cにおける抑制の解除は少ないようであった。Rts1因子によるT even phageのmodificationは表3、4に

見る如く、Rts1の細胞中で得られたphageも依然としてrestrictionを受けmodificationは受けないものと考えられる。但し、T6 phageをRts1をもつ細胞中で増やす時、やむおえず37°C平板培養温度を用いた。T4b、T4dについても同じような実験を行ったが、modificationを受けるという成績は否定的であった。

T6 phageのE. coli BSによる吸着は、表5に示す如く、Rts1を持っているかないかによって影響を受けない。Moiが0.1~0.5の間になるようにT6 phageをR⁻又はRts1⁺のBS細胞と混合し、25°Cで30分吸着させた後の上清中のphage particle数はすべての投入phageの1/10以下に減少しており、R因子に持たないBSに

表1 Restriction of T even phages by coexisting R factors

| R factor | temp °C | Efficiency of plating (E. O. P) | | | | |
|--------------------------|------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|------|
| | | T2h | T4b | T4d | T6 | P1KC |
| W3630: R ⁻ | 25 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | |
| | 37 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| | 43 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| W3630: Rts1 | 25 | 1.0×10 ⁻⁵ | >3.9×10 ⁻⁹ | >2.1×10 ⁻⁹ | 2.6×10 ⁻⁷ | |
| | 37 | 0.42 | 1.3×10 ⁻² | 7.4×10 ⁻² | 0.18 | 3.8 |
| | 43 | 0.61 | 0.17 | 0.24 | 0.21 | 1.17 |
| W3630: R100 | 25 | 0.86 | 0.84 | 1.31 | 0.80 | |
| | 37 | 1.27 | 0.52 | 1.31 | 0.76 | 2.3 |
| | 43 | 1.33 | 1.09 | 0.34 | 0.53 | 1.24 |
| W3630: Rts2 | 25 | >9.1×10 ⁻⁸ | >3.9×10 ⁻⁹ | >2.1×10 ⁻⁹ | 0.23 | |
| | 37 | 1.08 | 5.4×10 ⁻² | 3.7×10 ⁻² | 0.73 | 1.03 |
| | 43 | 0.89 | 0.57 | 0.16 | 0.29 | 1.5 |
| W3630: Rts3 | 25 | >9.1×10 ⁻⁸ | 1.5×10 ⁻⁴ | >2.1×10 ⁻⁹ | 2.6×10 ⁻⁹ | |
| | 37 | 1.57 | 5.2×10 ⁻⁸ | 1.9×10 ⁻² | 0.30 | 0.2 |
| | 43 | 1.22 | 0.33 | 2.0×10 ⁻² | 0.12 | 6.55 |

表2 Restriction of T even phage by coexisting R factors E. coli BS×T4b

| R factor | Efficiency of plating (E. O. P) | | |
|-------------------|---------------------------------|-----------------------|------|
| | 25°C | 37°C | 43°C |
| BS:R ⁻ | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| BS:Rts1 | >1.1×10 ⁻⁸ | >9.1×10 ⁻⁵ | 0.63 |
| BS:R100 | 0.35 | 0.92 | 1.70 |
| BS:Rts1;R100 | >5.9×10 ⁻⁹ | 1.4×10 ⁻⁴ | 0.06 |
| BS:Rts2 | >1.1×10 ⁻⁸ | >9.1×10 ⁻⁵ | 0.20 |
| BS:Rts3 | 0.24 | 1.80 | 3.7 |
| BS:Rts1;NR73 | >1.1×10 ⁻⁸ | >9.1×10 ⁻⁵ | 0.57 |
| BS:Rts1;NR75-1 | 1.1×10 ⁻⁷ | >9.1×10 ⁻⁵ | 0.60 |

表 3 No modification of the T6 phage propagated in the cells of *E. coli* W3630 carrying or not carrying Rts1

| R factor | Temp °C | Efficiency of plating | |
|----------------------|------------|----------------------------|-----------------|
| | | phage T6 (R ⁻) | phage T6 (Rts1) |
| W3630:R ⁻ | 25 | 1.00 | 1.00 |
| | 37 | 1.00 | 1.00 |
| | 43 | 1.00 | 1.00 |
| W3630:Rts1 | 25 | 0 | 0 |
| | 37 | 0.41 | 0.1 |
| | 43 | 0.34 | 0.5 |
| W3630:Rts1;R100 | 25 | | |
| | 37 | 1.4 | 4.6 |
| | 43 | 1.2 | 2.2 |

表 4 No modification of the T6 phage propagated in the cells of *E. coli* BS carrying or not carrying Rts1

| R factor | Temp °C | Efficiency of plating | |
|-------------------|------------|----------------------------|-----------------|
| | | phage T6 (R ⁻) | phage T6 (Rts1) |
| BS:R ⁻ | 25 | 1.00 | 1.00 |
| | 37 | 1.00 | 1.00 |
| | 43 | 1.00 | 1.00 |
| BS:Rts1 | 25 | 0 | 0 |
| | 37 | 0.49 | 0.53 |
| | 43 | 0.91 | 1.55 |
| BS:Rts1;R100 | 25 | 0 | 0 |
| | 37 | 0.37 | 0.80 |
| | 43 | 0.68 | 0.75 |

表 5 Adsorption of the phage by the cells of *E. coli* BS carrying or not carrying R factors

| Coexisting R factor | No. of phage particles addecl | No. of bacterial cells mixed | M.O.i | No. of phage remain- necl in sup | Adsorption ratio in % |
|---------------------|-------------------------------|------------------------------|-------|-------------------------------------|--------------------------|
| BS:R ⁻ | 7.7×10^7 /cc | 1.2×10^9 /10cc | 0.064 | 5.0×10^5 | 94 |
| BS:Rts1 | 7.7×10^7 /cc | 3.8×10^8 /10cc | 0.20 | 3.0×10^5 | 96 |
| BS:Rts1;R100 | 7.7×10^7 /cc | 1.9×10^8 /10cc | 0.41 | 1.0×10^6 | 87 |

吸着される率は94%, Rts1を持つBSに吸着されたT6は96%, Rts1, R₁₀₀の双方をもつものによっては87%のphageが吸着され, 3者の間で有意差は認め難い。

これらの実験途上においてRts1をもつ*E. coli* BS細胞とT even phageの濃厚な浮遊液を混合してE. O. P.を調べる時に, しばしばLysis from withoutに似た現象が認められたため, Rts1のT evenによるrestriction

がphageの広い意味でのreplication阻害による既知の現象か, あるいは非常に小さいplaqueを形成するためにみかけ上そうなるのか判別するために, *E. coli* BSを指示菌としてinfective centerの数を調べた。表6に示した如く, 平板培養温度を25°Cにしても37°CにしてもT6 phageを吸着したBS:R⁻細胞は, ほとんどすべてinfective centerになり得るが, T6 phageを吸着した

表 6 Maturation of the phage T6 adsorbed by the cells of *E. coli* BS carrying or not carrying R factors

| Coexisting Rfactor | No. of bacterial cells adsorbing T6 phage | No. of infective centers against BS:R ⁻ | | No. of phage after the burst | |
|--------------------|---|--|-----------------------|------------------------------|-----------------------|
| | | 25°C | 37°C | 25°C | 37°C |
| BS:R ⁻ | 7.7 × 10 ⁶ | 5.1 × 10 ⁶ | 8.2 × 10 ⁶ | 7.3 × 10 ⁸ | 1.1 × 10 ⁹ |
| BS:Rts1 | 7.6 × 10 ⁶ | 4.8 × 10 ⁴ | 9.8 × 10 ⁴ | 1.5 × 10 ⁵ | 2.2 × 10 ⁵ |
| BS:Rts1;R100 | 7.8 × 10 ⁶ | 6.3 × 10 ⁴ | 7.7 × 10 ⁴ | 2.0 × 10 ⁴ | 5.0 × 10 ⁴ |

Rts1 をもつ細胞あるいは Rts1 ; R₁₀₀ 因子をもつ BS 細胞は 1/100 以下しか infective center になり得ない。また R⁻ の BS 細胞に吸着された T6 phage は 90 分の 25°C incubation によって 100 倍以上に増加しているにもかかわらず、Rts1⁺ をもつ細胞に吸着された T6 は同様の保温によっても 2 倍以下しか増加しておらず、この 2 つの成績を考え合せると、Rts1 による T even phage の restriction は phage 吸着後のどこかの段階を抑制してその replication をおさえるのが原因であって、burst size が小さいために plaque の大きさが極めて小さくなって肉眼では見えないみかけ上の restriction ではないかという疑いは解消された。

考 察

現在 fi⁺ 型の R 因子は調べられた範囲で如何なる phage にも restriction を示さず、fi⁻ 型 R 因子は phage λ, P₁kc, T₁ に対して restriction を示すことが知られている。(吉川⁽⁷⁾, 渡辺⁽⁸⁾) Rts1 は P₁kc, λ に対しては restriction を示さないが、すべての培養温度を 25°C で行った場合、T even phage に対して強い restriction が認められ、37°C 以上になると極めて弱くなるか、あるいはほとんど解除されることは非常に興味深いことである。さらに fi⁻ R 因子による λ および P₁kc 等に対する restriction は一度これらの phage が fi⁻ R 因子をもつ菌の中で増殖した場合 modification を受け、もはや同じ fi⁻ R 因子によっては restriction を受けないことが知られているが(吉川⁽⁷⁾, 渡辺⁽⁸⁾)、Rts1 因子は Rts1⁺ の細胞中で得られた T even phage をも restriction するため、modification は受けないものと考えられる。又すでに fi⁻ R 因子による λ および P₁kc 等の restriction は、その吸着の段階を阻害せず、菌体内に貫入後、phage DNA が degradation するために起る(吉川⁽⁷⁾, 高野⁽⁸⁾) ことが知られているが、T6 phage の *E. coli* BS による吸着もその菌が Rts1 を持っているかないかにより影響を受けない。これら実験途上我々はしばしば、Lysis from without に似た現象に出合った。これらは phage のもつ Lytic enzyme によって真の Lysis from

without が起る場合と、肉眼的には鑑別し難い程小さい plaque が重なり合って起る場合と考えられたため、infective center および吸着後の保温による free phage particle 数を調べた結果から、Rts1 による T even phage の restriction も phage 吸着後のどこかの段階を抑制して、その replication をおさえるのであって、burst size が小さいために肉眼では見えないみかけ上の restriction とは考えられなかった。

結論として、温度感受性 KM 耐性因子 Rts1 は T even phage をすべて restriction する。その restriction は 25°C で顕著であるが、37°C になると極めて弱くなり、43°C ではほとんど認められない。

Rts1 の T even phage に対する restriction は吸着の段階をおさえるために起るのではなく、それ以後の phage replication をおさえるものと考えられる。今後どの段階をおさえるのか検討を進めていきたい。

本研究は昭和44年6月13, 14日に開催された第22回日本細菌学会関東支部例会において発表された。

引用文献

- (1) TERAWAKI, Y. H. TAKATSU, and T. AKIBA. 1967 Thermosensitive replication of a kanamycin resistance factor. *J. Bacteriol.* 94: 687-690.
- (2) 横田健, 有泉昇, 金丸佳郎, 森礼子, (1967): 温度感受性 R 因子に関する研究 第1報 同一宿主菌細胞内に非温度感受性 R 因子と共存する時の態度 *Japan. J. Bacteriol.* (in Japanese) 22: 543
- (3) 横田健, 森礼子 (1968) 「温度感受性 R(KM)⁺ 因子と、温度感受性 R₁₀₀ (CM, TC, SM, SA) 因子との間に生ずる recombinants について」 *Japan. J. Bacteriol.* (in Japanese) 23: 495
- (4) 山下豊子, 横田健, (1969): 「温度感受性因子に関する研究 第5報 T even phage に対する restriction」 第22回日本細菌学会関東支部例会発表
- (5) 寺脇良郎, 吉川昌之介 (1969): 「Temperature sensitive R factor の感染による宿主菌の tempera-

ture sensitive growth の発現」Japan. J. Bacteriol 24 : 142

- (6) 高野利也, 静谷裕明, 渡辺力, (1967) : 「F因子およびコリシン因子による phage W-31 の restriction の機序, とくに phage DNA の機能発現の抑制について」Japan. J. Bacteriol (in Japanese) 22 : 541
- (7) YOSHIKAWA, M., and T. AKIBA, (1961) : Studies on transferable drug resistance in bacteria.

4. Suppression of plaque formation of phages by the resistance factov. Japan. J. Microbiol. 6 : 121-132

- (8) WATANABE, T., T. TAKANO, T. ARAI, H. NISHIDA and S. SATO, (1966) : Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. X. Restriction and modification of phages by fi^- R factors. J. Bacteriol. 92 : 477-486

4) 昭和42年度, 43年度における山梨県下における赤痢菌の薬剤耐性パターンとソソネ赤痢菌のコリシン型別について

金丸佳郎, 有泉昇
山下豊子, 横田健

はじめに

近年わが国で分離される赤痢菌は, 菌型としては *Sh. sonnei* が多く, またその薬剤耐性パターンは多剤耐性菌が優勢であることが知られている。全国平均を見てみると昭和42年度には, ソソネ菌が88%¹⁾, 多剤耐性菌²⁾が85%分離されている。山梨県でもこの例にもれず, 多剤耐性菌, ソソネ菌の分離率は相当高くなっている。本報には昭和42年および昭和43年山梨県下において分離された赤痢菌の薬剤耐性パターンとソソネ赤痢菌のコリシン型を検討した結果を報告したい。

方法

イ) 菌の同定法

TSI, SIM, リジン脱炭酸テスト, ブドウ糖リン酸ペプトン, SM, シモンズクエン酸, クリステンゼンクエン酸培地による生化学的性状, ためし凝集による抗原分析を型の如く実施した。

ロ) 薬剤耐性検査法

SA, TC, CM, SM, およびKMに対する耐性度を散発例については主に, ディスク法により, 集発例についてはレプリカ法 (SA 1000 μ g/ml, SM 25 μ g/ml, TC 25 μ g/ml, CM 25 μ g/ml, KM 30 μ g/ml 含有 Mac Conkey 平板使用) で調べた。

ハ) コリシン型別法^{3), 4)}

Sh. sonnei の Abbotto & Sannon のコリシン型別法により, わが国の薬剤耐性赤痢研究会コリシン型別研究会の方法によった。指示菌は, 埼玉衛生研究所, 岡田正次郎博士により分与されたものである。

結果

イ) 昭和42年度集発例: 4件; 168株, 散発例: 8件; 27株, 昭和43年度集発例: 4件; 262株, 散発例: 17件; 38株の菌型は表1および表2に示すごとく, 散発例の70~80%, 集発例の75%が *Sh. sonnei* によるものであった。

表1 山梨県下で昭和42年, 43年に分離された赤痢菌, 菌型 (散発例)

| 菌 型 | 昭 和 42 年 | | 昭 和 43 年 | |
|--------------------------|----------|----|----------|----|
| | 株 数 | % | 株 数 | % |
| <i>Sh. sonnei</i> I | 24 | 89 | 26 | 68 |
| <i>Sh. flexneri</i> 3 a | 3 | 11 | 8 | 21 |
| <i>Sh. flexneri</i> 3 b | | | 1 | 3 |
| <i>Sh. flexneri</i> 4 a | | | 2 | 5 |
| <i>Sh. flexneri</i> V. X | | | 1 | 3 |
| 計 | 24 | | 38 | |