

2) W 3630/Rts 1 由来の安定なカナマイシン耐性をもつ変異株について

春日徳彦, 金子通治, 横田 健

寺脇らにより *Proteus* より分離されたカナマイシン (KM) 1 剤耐性 R 因子は, それを有する菌を 43 °C で培養すると KM 耐性が高率に脱落すること, また伝達頻度が 25 °C でもっとも高く, 37 °C, 43 °C では低下することから 温度感受性 R 因子 (Rts 1) と記載された^(1, 2). Rts 1 の高温培養での脱落は, 主として高温での R 因子の DNA 増殖阻害によるものと考えられてきたが, 既に指摘されたように Rts 1 を有する菌の増殖速度は 43 °C で低下する⁽³⁾. 即ち 43 °C で W3630 は 1 分裂に要する時間が 30 分であるのに比し, W 3630/Rts 1 のそれは 72 分である⁽⁴⁾. したがって, W 3630/Rts 1 の培養中に自然脱落によって R⁻菌が生ずると, それは増殖速度が速いことから, 当然見かけ上の KM 耐性の脱落頻度を増加させることになり, Rts 1 の DNA 増殖が温度感受性であっても, 43 °C 培養での感受性菌の増加を Rts 1 因子の高温における複製阻害のみに帰することは適当でないと考えられる。

この観点から, Rts 1 を扱う上で今後とるべき 2 つの方向が考えられる。第 1 は Rts 1 の温度感受性を適確に表現するための指標として何をを用いるかということ。第 2 は Rts 1 がその宿主菌をどのようにして温度感受性にするかということである。われわれは第 2 の方向を追求する目的で W 3630/Rts 1 より 43 °C 培養において KM 耐性の安定な変異株を得たので, その性質について報告する。

材料および方法

使用菌株: 変異株を得る元株として *E. coli* W3630/Rts 1 を用いた。R 因子伝達の受容菌としては *E. coli* 58-161 Met^r に Nalioxic acid 耐性を付与したもの (58-161 NA^r) を用いた。また伝達性を失なった R 因子の伝達には R₁₀₀ (CM. TC. SM. SA^r) を用いた。

変異株のとり方: W 3630/Rts 1 を Penassay broth 中で 18 時間 37 °C で培養し, その菌液 5 ml を遠心して沈渣を KM 100 μg/ml を含むマッコンキー平板上に塗抹した。このようにして得られた平板 5 枚を 43 °C の孵卵器中で 18 時間培養した。大量の菌が塗抹されているため平板上全体に菌が発育しているが, この平板を KM 100 μg/ml を含むマッコンキー平板にレプリカし, 再び 43 °C で培養した。同様な操作を更に 2 回繰

り返した。それによって 43 °C で KM 耐性の脱落した菌の発育は完全に抑制され, 最後の平板より得られる集落は, 比較的 43 °C で KM 耐性の脱落の少ないものである。このような集落が 5 枚の平板から約 90 個得られた。

R 因子の脱落: Penassay broth 中に 1 ml あたり約 10³ 個の細胞数になるように菌を浮遊させ, 43 °C で 18 時間培養した。菌液を適当に稀釈して薬剤を含まないマッコンキー平板上に塗抹し, 37 °C で 18 時間培養した。適当数の集落が生じた平板を KM 100 μg/ml を含むマッコンキー平板にレプリカして脱落の率を求めた。

R 因子の伝達: 供与菌, 受容菌ともに Penassay broth 中で 18 時間培養し, 十分に増殖した菌液を Penassay broth で 50 倍に稀釈する。振盪培養して菌量が 1 ml あたり 10⁷ 個になったとき, 供与菌, 受容菌を各 2 ml と Penassay broth 4 ml を混和して振盪培養した。3 時間後にその 0.1 ml を選択平板上に塗抹した。伝達頻度の低い場合は更に 18 時間静置して混合培養をおこない, そこで選択平板上に塗抹した。得られた伝達株は 3 回の純培養を繰り返した。

結果と考察

変異株の性質: 材料および方法に前述したように, 43 °C で KM 耐性が比較的安定と考えられる約 90 の集落が得られた。これらの集落を拾い, 純培養を繰り返しながら broth 中での KM 耐性の安定性を検査して, 脱落のみられたものは除外した。結局表 1 の 5 菌株 (st 1, 3, 4, 7, 8) が 43 °C 培養での KM 耐性の脱落率が非常に少ない株として得られた。これらは KM 耐性が安定なことから st-mutant と名づけられた。

表 1 に示すようにこれらの変異株においても 43 °C 培養で KM 耐性の脱落がないのではなく, その意味では leaky mutant と考えられるが, 元株の KM 耐性が同一条件で 95% 以上の脱落を示すことと比較すれば, これらの株の KM 耐性は非常に安定である。ここでもっとも KM 耐性の安定な st 3, st 7 株を以後の実験に用いることにした。両株とも 43 °C 培養での KM 耐性の脱落は僅かに 0.4% であった。

st 1 および st 3 の増殖速度を図 1 に示した。

Stable KM^r mutant, w3630Rts1-st

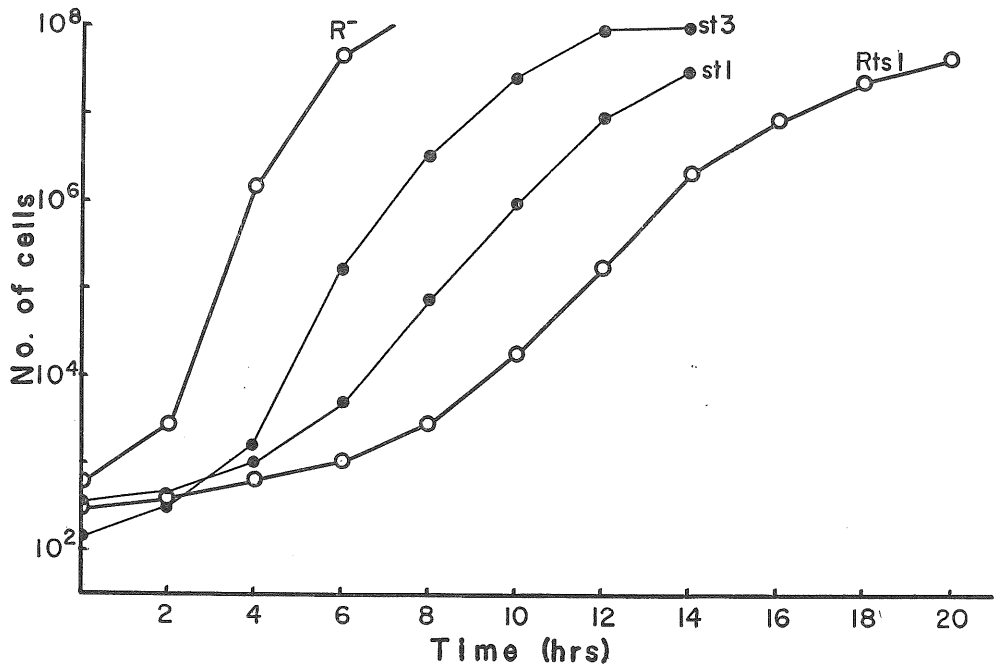


表1 Loss of KM^r in st-mutants

Strain	No. of colonies tested	No. of KM^- colonies	Loss of KM^r (%)
st 1	102	4	3.8
st 3	227	1	0.4
st 4	56	2	3.5
st 7	250	1	0.4
st 8	105	2	1.9

他の st-mutant の増殖曲線もすべて W 3630/ R^- 株と元株 W 3630/Rts 1 の間にあり、1 分裂に要する時間は W 3630/ R^- が 30 分、W 3630/Rts 1 が約 70 分であるのに対し、st-mutant のそれはほぼ 40~45 分であった。st 7 の増殖曲線は st 3 のそれとほぼ一致し、表 1 に示した 43 °C での KM 耐性の脱落率の低さと、図 1 での増殖速度の速さの間に並行関係が認められた。

ついで st-mutant を供与菌として KM 耐性の伝達を試みたが、25 °C、37 °C いずれにおいても伝達株は得られなかった (表 2)。

このことから変異株において、 KM 耐性が安定化すると同時に伝達性が失なわれていることが明らかとなった。

宿主菌の変異による可能性 : st-mutant が R 因子上の

表2 Transfer of KM^r in st-mutant

Temp	Donor	Transfer frequencies		
		2 h	4 h	6 h
37 °C	W3630 Rts 1-st 3	$10^{-7} >$	$10^{-7} >$	$10^{-7} >$
	〃 -st 7	$10^{-7} >$	$10^{-7} >$	$10^{-7} >$
	W3630 Rts 1	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}
25 °C	W3630 Rts 1-st 3	$10^{-7} >$	$10^{-7} >$	$10^{-7} >$
	〃 st 7	$10^{-7} >$	$10^{-7} >$	$10^{-7} >$
	W3630 Rts 1	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}

Recipient : 58-161 NA^r

Selection : $KM^- NA$

変異によって生じたのか、或いは宿主菌の変異によったものかを、表 1 において得られた st 3 の KM 耐性を失なった株に正常な Rts 1 を再び入れ、その安定性を調べることで確認することを試みた。

表 3 にその伝達頻度を示したがほぼ対照と同様に伝達される。得られた Rts 1 の伝達株 3 株について、43 °C 培養での KM 耐性の安定性をみだが、表 4 に示し

表3 Transfer of Rts 1 to st-3 lost KM^r

Donor	Recipient	Selection	Transfer freq.
58-161 Rts 1	W3630 Rts 1 -st 3-KM ^s	EMB·lac·KM	3.7 × 10 ⁻⁴
	W3630		1.1 × 10 ⁻³

表4 Thermosensitivity of KM^r

Strain	No. of colonies tested	KM ^r colonies	Loss of KM ^r (%)	
W3630 Rts 1·st 3-KM ^s -Rts 1	(1)	1280	114	91.2
	(2)	1367	135	90.1
	(3)	150	7	95.3
W3630·Rts 1	984	34	96.5	

たように KM 耐性は不安定であった。

このことから st 3 が宿主菌の変異によって生じた可能性は少ないと考えられる。

R₁₀₀による安定な KM 耐性の伝達：前項で述べたように、宿主菌の変異によって KM 耐性が安定化したのではないならば、変異は R 因子上におこったと考えられる。ところが表 2 が示したように安定化した KM 耐性は伝達性を失っているため、他の R 因子によって KM 耐性を伝達させることで R 因子が変異をおこしているかどうかを調べた。表 5 は st 3 を受容菌として R₁₀₀ を伝達した時の伝達頻度であるが、対照とほぼ同様に伝達された。

表5 Transfer of R₁₀₀ to st-3 mutant

Donor	Recipient	Selection	Transfer freq.
58-161 R ₁₀₀	W3630 Rts 1-st 3	EMB-lac-CM	2.2 × 10 ⁻³
	W3630		7.5 × 10 ⁻³

得られた伝達株を供与菌として 25°C, 37°C でクロラムフェニコール (CM), テトラサイクリン (TC), ストレプトマイシン (SM), および KM で選択して R 因子の伝達をおこなった。25°C, 37°C のいずれでも CM, TC, SM 選択では、得られた伝達株の耐性型は CM. TC. SM. SA を示した。これは R₁₀₀ の耐性型と同一であり、これらの選択では R₁₀₀ のみが単独で伝達されたことを示す。

ところが 37°C での KM 選択の場合のみがこれらと異なり、耐性の伝達頻度が 10⁻⁶ と低く、しかも得られた 12 の伝達株の耐性型は、CM. TC. SM. SA. KM の 5 剤耐性株が 5 株、他はいずれも上記 5 剤から TC 耐性のない 4 剤耐性株であった (表 6)。

KM 選択によって得られた 2 種の伝達株について 43°C 培養での KM 耐性の安定性を調べたところ、5 剤耐性株の KM 耐性は不安定であったが、TC 耐性のない 4 剤耐性株の KM 耐性では脱落がみられなかった (表 7)。

この 2 種の伝達株を供与菌とした再伝達をおこなって耐性の解離を検討した。表 8 に示したように TC 感受性の 4 剤耐性株 (4^r TC^s) では耐性の解離はないが、5 剤耐性株では KM 耐性の解離が認められた。

最後に R₁₀₀ による変異株の安定化した KM 耐性の伝

表6 Transfer of KM^r in st-3 mutant with R₁₀₀

Temp.	Selection	Transfer frequencies	No. of colonies tested	Resistans patterns		
				CM·TC·SM·SA	4 ^r TC ^s	5 ^r
37 C	CM·NA	1.1 × 10 ⁻²	25	25		
	TC·NA	1.3 × 10 ⁻²	25	25		
	SM·NA	7.0 × 10 ⁻³	25	25		
	KM·NA	1.3 × 10 ⁻⁶	12		7	5
25 C	CM·NA	2.7 × 10 ⁻⁵	25	25		
	TC·NA	5.4 × 10 ⁻⁵	25	25		
	SM·NA	2.1 × 10 ⁻⁵	25	25		
	KM·NA	10 ⁻⁷ >	—			

Donor : W3630 Rts 1-st 3 · R₁₀₀

Recip : 58-161 NA^r

表7 Thermosensitivity of transferred resistance

Strain	No. of colonies tested	No. of KM ^r colonies	Loss of KM ^r (%)
58-161 NA ^r . 5 ^r	1038	109	89.5
58-161 NA ^r . 4 ^r TC ^s	523	523	0

表8 Re-transfer of resistance

Donor	Selection	Transfer frequencies	Resistance patterns			
			4 ^r TC ^s	4 ^r KM ^s	5 ^r	KM ^r
58-161 NA ^r . 4 ^r TC ^s	KM	7.2×10^{-4}	25/25			
	CM	2.1×10^{-3}	25/25			
58-161 NA ^r . 5 ^r	KM	3.8×10^{-6}			3/16	13/16
	CM	1.5×10^{-3}		25/25		

Recipient : W3630

表9 Transfer of stable KM^r in st-3 mutant with R₁₀₀

Selection	Resistance patterns	Unstable resistance	
KM	Large colony {	CM·TC·SM·SA·KM	KM
		CM	SM·SA·KM
		SM·SA·KM	SM·SA·KM
	Small colony {		KM
		CM·TC·SM·SA·KM	KM
		CM	SM·SA·KM
CM	{	CM·TC·SM·SA·KM	
		CM·TC·SM·SA	

達様式を、他の伝達実験の結果を加味して表9にまとめて示した。

論 議

いわゆる温度感受性 R 因子、Rts 1 が宿主菌を温度感受性にする原因を追求する目的で、高温培養で KM 耐性の安定な変異株を得た。この変異株について変異した形質を追求することによって、温度感受性の本質に対する知見の得られることが期待された。しかし今回得られた変異株では、その変異がおそらく宿主菌の変異によるも

のではないと考えられる (表3, 4)。また R₁₀₀ による KM 耐性の伝達実験から表9に示されたように (1) CM. TC. SM. SA. KM. (2) CM. SM. SA. KM. (3) SM. SA. KM. (4) KM の4種の伝達株が得られた。これらの伝達株の検討から (1) は R₁₀₀ と Rts 1 の共存したものであり、(2) は R₁₀₀ と Rts 1 の Recombinant と考えられ、(3) は既に Yokota らの記載した Rts 2⁽²⁾ と同様のものであり、(4) は Rts 1 そのものであると考えられた。KM 耐性の安定化した変異株から、伝達によって再び Rts 1 と同じものが得られたことは、st-mutant において R 因子 そのものにも変異が生じていなかったことを示す。したがって今回得られた変異株では、変異は宿主染色体、R 因子のいずれにも生じていないことになる。st-mutant における KM 耐性の安定化の原因は、今回の実験では Rts 1 の宿主菌内での存在様式の変化であろうことが推測されるのみである。したがって今後これとは異なった KM 耐性の安定な変異株を得る必要が生ずる。

しかし今回得られた変異株について、表1および図1に示されたように KM 耐性が安定化すれば増殖速度が上昇することから、W 3630/Rts 1 の 43 °C 培養での KM 耐性の高率な脱落には、高温による感受性菌の選択が、重要な要因となっていることが示唆される。

最後に R₁₀₀ と Rts 1 との、CM. SM. SA. KM 耐性を有する Recombinant についてであるが、Yokota らは既に同様な耐性型を示す温度感受性の Recombinant R を得ている⁽²⁾。その R 因子は、いわゆる t region が Rts 1 由来であったと考えられる。今回得られた 4 剤耐性の Recombinant R は t region が R₁₀₀ 由来と考えられ、もしそうであれば導入が可能であるから、R₁₀₀ 上に Rts 1 由来の KM 耐性遺伝子の組み込まれた場所を知ることができる筈である。Rts 1 と他の R 因子との Recombinant R が温度感受性、非温度感受性いずれの場合も、TC 耐性を失っていること、即ち TC 耐性遺伝子と Rts 1 由来の KM 耐性遺伝子とが同一遺伝単位上に共存し得ないことは極めて興味ある事実であり、今回得られた Recombinant R はその点を追求する上で重要な意味をもつものと考えられる。

要 約

1. いわゆる温度感受性 R 因子、Rts 1 を有する *E. coli* W 3630 株から、高温培養で KM 耐性の脱落し難い変異株を得た。
2. この変異株では増殖速度が W 3630/R⁻ と W 3630/Rts 1 の間にあり、また KM 耐性の伝達性を失っていた。

3. この変異株において宿主染色体, R因子のいずれにも変異は生じていないと考えられた。したがってKM耐性安定化の原因は, R因子の宿主菌内での存在様式の変化と推測された。
4. 安定化し, 同時に伝達性を失なったKM耐性をR₁₀₀⁰の介在によって伝達されることにより, (1) CM. TC. SM. SA. KM. (2) CM. SM. SA. KM. (3) SM. SA. KM. (4) KMの4種の伝達株が得られた。それらの検討から (1)はR₁₀₀とRts 1の共存株, (2)はR₁₀₀にRts 1のKM耐性の組み込まれた Recombinant Rをもつ株, (3)はRts 1にR₁₀₀のSM. SA耐性の組み込まれた Recombinant Rをもつ株, (4)はRts 1をもつ株であると考えられた。

引用文献

- (1) Terawaki, Y., H. Takayasu, and T. Akiba. 1967. Thermosensitive replication of a kanamycin resistance factor. *J. Bacteriol.* 94 : 687-690.
- (2) Yokota, T., Y. Kanamaru, R. Mori, and T. Akiba. 1969. Recombination between a thermosensitive kanamycin resistance factor and a nonthermosensitive multiple-drug resistance factor. *J. Bacteriol.* 98 : 863-873.
- (3) Terawaki, Y., Y. Kakizawa, H. Takatsu, and Y. Yoshikawa. 1968. Temperature sensitivity of cell growth in *Escherichia coli* associated with temperature sensitive R (KM) factor. *Nature* 219 : 284-285.
- (4) 春日徳彦, 金子通治, 横田 健. 1970. 温度感受性R因子の脱落について 日本細菌学雑誌 25 (印刷中)。

3) コレラ菌内におけるR因子の増殖と脱落

金子通治, 春日徳彦, 横田 健

研究目的

1959年, 秋葉⁽¹⁾, 落合ら⁽²⁾により発見された細菌の薬剤耐性を支配する細胞質性遺伝因子, R因子はその後の研究で腸内細菌科のすべての種に伝達するのみならず, 桑原ら⁽³⁾によってコレラ菌へも伝達可能であることが報告された。しかし, コレラ菌内ではR因子は不安定であることも明らかにされた。一方1967年, 寺脇ら⁽⁴⁾によって報告された温度感受性カナマイシン(KM)一剤耐性R因子, すなわちRts 1は, 横田⁽⁵⁾によって大腸菌からコレラ菌へ伝達されることが報告されたが, この場合, 大腸菌内におけると同様低温においてこのR因子はコレラ菌内でも安定性を保った。

今回, コレラ菌内での耐性脱落のKineticsをとることによりR因子の不安定性を量的に表現することを目的にし, また, コレラ菌から大腸菌へのR因子の逆伝達を行なうことによって耐性の解離が起こるかどうか, コレラ菌内でR因子の修飾が起こるか否かを知ることを目的にして実験を行なったので, その結果を報告する。

材料および方法

使用菌株 : DonorとしてRts 1をもつ *V. cholerae* El Tor type, strain E1. Recipientとしては, *E. coli*

58-161および, それにNalidixic acid耐性をmutationによって付与した株, 58-161 NA^rを使用した。R₁₀₀の伝達には, Donorとして, *E. coli* W 3630/R₁₀₀, Recipientとして *V. cholerae* E1-NA^rを用いた。

使用培地 : 液体培地として Penassay broth (Difco) を使用し, *V. cholerae* を RecipientとしたRの伝達には, TCBS 寒天培地 (pH 8.0に修正) (栄研) を使用し, コレラ菌から大腸菌へのR因子の伝達には, Mac-Conkey 寒天培地 (栄研) を使用した。

使用薬剤 : 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 (山之内製薬K.K.)
Tetracycline (Aureo. powder ; 日本レダリーK.K.)
Nalidixic acid (第一製薬K.K.)
Sulfonamide (ナトリウム塩, 大日本製薬K.K.)

Rの伝達 : 大腸菌からコレラ菌への伝達は, 横田⁽⁵⁾の方法によった。また, コレラ菌から大腸菌への伝達方法は, donor および recipient を独立に penassay broth 中で, 25 °C, 18時間静置培養後, donor 3 ml, recipient 3 ml, および新鮮 penassay broth 4 ml の割合で混合し, 25 °C 3時間振盪培養したもの, 24時間培養のものを各々の選択培地に塗抹した。伝達したと