

- resistance factor. J. Bacteriol. **94** : 687-690.
- (5) Yokota, T., 1968. Thermosensitive and nonthermosensitive R factors in *Enterobacteriaceae* and *Vibrio comma*. Ann. Rep. of Yamana-shi Pref. Inst. of Public Health **12** : 68-77.
- (6) Kasuga, T., M. Kaneko, and T. Yokota. 1970. Loss of thermosensitive R factor, Rts 1.

- Japan. J. Bacteriol. **25** : (in press).  
(in Japanese)
- (7) Watanabe, T., 1963. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. VI. High-frequency resistance transfer system in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **85** : 788-794.

## 4) Col 因子と R 因子の相互関係について

金丸佳郎, 春日徳彦, 横田 健

### はじめに

Plasmid 間の干渉現象は、その Plasmid のマーカー部分以外の Plasmid の本体、つまり増殖、伝達能などに関与する部分の相互関係を知るのに重要な手がかりを与える。同種 Plasmid 間の相互関係については、R 因子で原田ら<sup>(1)</sup>、渡辺ら<sup>(2)</sup>の多くの報告があり、又コリシン因子については、Stocker ら、岡田ら<sup>(3)</sup>の報告がある。異種 Plasmid 間の相互関係については、渡辺らによれば R 因子と Col 因子との間に近縁性が示唆されるが、重感染免疫については特異的な関係は認められないという<sup>(4)</sup>。一方芦田らの報告によると  $fi^-$ 型 R 因子と Col Ib との重感染において伝達の阻害はみられないか、両者は共存せず、 $fi^-$ 型 R 因子は Col Ib によって排除されるという<sup>(5)</sup>。この様に、異種 Plasmid 間の相互関係は極めて興味ある事実を与えるが、これを広く総合的に研究する事は、自然界に存在する多くの Plasmid の類縁関係を明らかにし、Plasmid 本体の分類に有用であると考えられる。

ところで、自然界より分離される赤痢ソネ菌のコリシン型は14型がもっとも多く、しかもそのほとんどが、CM, SM, TC, SA, の4剤耐性であり、その持っている R 因子は  $fi^+$ 型である。このコリシン型と耐性型の関係については、大阪公衛研の興味ある報告がある。それは赤痢の集発例におき初発がコリシン13A型、耐性型 CM, SM, SA, であったものが、中途からコリシン14型、耐性型 TC, CM, SM, SA, に変わったものである。コリシン型13Aと14は Col E. が共通であり、前者は、その他に Col Ia, 後者は Col Ib を持っている。従って耐性型と Col 因子が関係あるとすれば、それは R 因子と Col Ia 及び Ib との関係においてみる事が出来る可能性がある。この観点から我々は、R 因子と Col 因子の相互関係を検討したので、その一部を報告する。

### 材料及び方法

#### 1) 材 料

##### ① 使用菌株

- E. Coli W3110 ( $F^-$ , gal<sup>+</sup>)  
E. Coli W3110 ( $F^-$ , Mal<sup>+</sup>)  
E. Coli CSH2 ( $F^-$ , Lac<sup>+</sup>, Met<sup>-</sup>)  
E. Coli W3110 : Ib  
E. Coli W3110 : E<sub>1</sub>  
E. Coli W3110 : Ib + E<sub>1</sub>  
E. Coli W3630 : R<sub>100</sub> (CM, SM, TC, SA) ;  $fi^+$   
E. Coli W3630 : R<sub>100-1</sub> (CM, SM, TC, SA) ;  $fi^-$   
E. Coli W3630 : NR 73 (SM, TC, SA) ;  $fi^-$   
E. Coli W3630 : Rts 1 (KM)<sup>t</sup> ;  $fi^-$   
A 法 Typestrain 100049 (Sh. sonnei)  
A 法 Typestrain 100051 (Sh. sonnei)  
E. coli K 12-Row  
E. Coli K 12-Row/I  
E. Coli K 12-Row/E.

##### ② Col 及び R 因子

Col 因子として、Col Ib, Col E, は B. Coli W 3110 に A 法 Type strain. 100049, 100051 の Col 因子を、E. Coli CSH 2 を通じ移して用いた。又、R 因子として、それぞれ性質の異なると思われる  $fi^-$  R 因子の NR73, R<sub>100</sub>由来の  $fi^-$  mutant の R<sub>100-1</sub> 及び温度感受性 KM 耐性因子 Rts 1,  $fi^+$  の R<sub>100</sub> を E. Coli W3630 に入れて使用した。

##### ③ 使用培地

- Leder berg の EMS 寒天培地  
Mac Conkey 寒天培地 (糖ぬき, 栄研化学 K.K.)  
普通寒天培地 (栄研化学 K.K.)  
Penassay broth (Difco)

④ 薬 剤

- Kanamaicin (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)
- Maltose (和光純薬 K.K)

2) 方 法

④ R 因子及び Col 因子を持つ各々の菌を 37 °C で Penassay broth 中で 18 時間前培養を行なう。Penassay broth で 10 倍に希釈して, 3 時間振盪培養した後, 培養液中の Colicin を除去する目的で, 3,000 回転 25 分遠心を行ない, 沈渣を 10 cc に再浮遊させた。各々の菌液 2 cc と, 新鮮 Penassay broth 3 cc を混和し, 1 時間振盪培養した。適当に希釈して, その各々を薬剤加 Maltose 平板 (Mac Conkey-plate, EMS-Plate) 及び薬剤を含まない Mac Conkey-maltose 平板に 0.1 cc づつ撒き, 37 °C 18 時間培養した。薬剤加平板上のコロニーについては, W3630 より R 因子が W3110 へ移行した頻度を調べ, 薬剤を含まない Mac Conkey-maltose 平板上の集落は, W3110 より Col 因子が W3630 に移行した頻度を調べた。検査コロニー数はいずれの組合せでも 100 ケが標準である。なお選択薬剤は R<sub>100</sub> および R<sub>100-1</sub> は CM (25 γ/ml), NR 73 は SM (25 γ/ml), Rts 1 は KM (50 γ/ml) で行なった。コリシン

産生能は穿刺培養法によって調べた。

- ⑤ 以上の伝達実験から得られた; E. Coli W 3110 : Col<sup>+</sup>; R<sup>+</sup> 株について, 7 代薬剤プレートに継代後 Penassay broth 中で 37 °C, 18 時間静置培養し, Mac Conkey-maltose 平板に画線後 レプリカ法により耐性マーカーの安定性を調べた。
- ⑥ 相互伝達実験で得られた E. Coli : R<sup>+</sup>; Col<sup>+</sup> 株, 及び, R 因子の安定性を調べた W 3110 : Col<sup>+</sup>; R<sup>+</sup> 株について 3 ケ月保存後, Penassay broth で 5 代継代した後, Mac 平板に画線し出現した Colony 50 ケについて, 耐性マーカー及び, Colicin 産生能を調べた。

3) 実 験 成 績

④ fi<sup>+</sup> R<sub>100</sub> 因子を Col Ib 因子を持つ細胞に伝達させる時その伝達頻度は, Col<sup>-</sup> 菌を受容菌とする場合に較べ約 100 倍高い。しかし, Col E<sub>1</sub> 因子のみを持つ細胞への伝達においては, 伝達頻度の差は著明ではない (表 1)。

R<sub>100</sub> の fi<sup>-</sup> 型変異因子である R<sub>100-1</sub> を種々の Col 因子を持つ菌に伝達させた時の伝達頻度は受容菌がどの種類の Col 因子を持っているかによる相違は見られない (表 2)。

本来の fi<sup>-</sup> である NR 73 因子 (I-like 因子) の伝達は受容菌が Col Ib および E<sub>1</sub> の いづれを持っていても促進された (表 3)。

Rts 1 因子の伝達も受容菌が Ib は E<sub>1</sub> をもつことに

表 1 R<sub>100</sub> の 伝 達 頻 度

Cross (Temp. 37 °C)	<i>E. coli</i> W3110 R <sup>+</sup>	<i>E. coli</i> W3630	<i>E. coli</i> W3110	Frequency
R <sub>100</sub> × Ib	2.6 × 10 <sup>4</sup>	4.0 × 10 <sup>7</sup>	1.2 × 10 <sup>7</sup>	6.5 × 10 <sup>-4</sup>
R <sub>100</sub> × E <sub>1</sub>	2.0 × 10 <sup>2</sup>	1.7 × 10 <sup>7</sup>	7.0 × 10 <sup>7</sup>	1.2 × 10 <sup>-5</sup>
R <sub>100</sub> × Ib + E <sub>1</sub>	2.3 × 10 <sup>4</sup>	5.4 × 10 <sup>7</sup>	1.9 × 10 <sup>8</sup>	4.2 × 10 <sup>-4</sup>
R <sub>100</sub> × S	1.6 × 10 <sup>2</sup>	4.9 × 10 <sup>7</sup>	9.3 × 10 <sup>7</sup>	3.3 × 10 <sup>-6</sup>

表 2 R<sub>100-1</sub> の 伝 達 頻 度

Cross (Temp. 37 °C)	<i>E. coli</i> W3110 R <sup>+</sup>	<i>E. coli</i> W3630	<i>E. coli</i> W3110	Frequency
R <sub>100-1</sub> × Ib	9.0 × 10 <sup>3</sup>	2.0 × 10 <sup>6</sup>	5.0 × 10 <sup>7</sup>	4.5 × 10 <sup>-3</sup>
R <sub>100-1</sub> × E <sub>1</sub>	5.0 × 10 <sup>3</sup>	7.0 × 10 <sup>6</sup>	1.0 × 10 <sup>7</sup>	7.1 × 10 <sup>-4</sup>
R <sub>100-1</sub> × Ib + E <sub>1</sub>	6.0 × 10 <sup>3</sup>	2.3 × 10 <sup>6</sup>	2.6 × 10 <sup>7</sup>	2.6 × 10 <sup>-3</sup>
R <sub>100-1</sub> × S	5.1 × 10 <sup>4</sup>	3.3 × 10 <sup>7</sup>	1.2 × 10 <sup>8</sup>	1.5 × 10 <sup>-3</sup>

表 3 NR 73 の伝達頻度

Cross (Temp. 37 °C)	<i>E. coli</i> W3110 R <sup>+</sup>	<i>E. coli</i> W3630	<i>E. coli</i> W3110	Frequency
NR 73×Ib	1.1×10 <sup>5</sup>	2.1×10 <sup>7</sup>	5.1×10 <sup>7</sup>	5.2×10 <sup>-8</sup>
NR 73×E <sub>1</sub>	6.2×10 <sup>4</sup>	1.6×10 <sup>7</sup>	5.1×10 <sup>7</sup>	3.9×10 <sup>-8</sup>
NR 73×Ib+E <sub>1</sub>	1.2×10 <sup>5</sup>	7.0×10 <sup>6</sup>	7.4×10 <sup>7</sup>	1.7×10 <sup>-2</sup>
NR 73×S	3.0×10 <sup>3</sup>	3.0×10 <sup>7</sup>	1.5×10 <sup>8</sup>	1.0×10 <sup>-4</sup>

表 4 Rts 1 の伝達頻度

Cross (Temp. 25 °C)	<i>E. coli</i> W3110 R <sup>+</sup>	<i>E. coli</i> W3630	<i>E. coli</i> W3110	Frequency
Rts 1×Ib	1.6×10 <sup>3</sup>	7.5×10 <sup>6</sup>	3.9×10 <sup>6</sup>	2.1×10 <sup>-4</sup>
Rts 1×E <sub>1</sub>	1.0×10 <sup>3</sup>	3.6×10 <sup>6</sup>	1.9×10 <sup>7</sup>	2.8×10 <sup>-4</sup>
Rts 1×Ib+E <sub>1</sub>	1.7×10 <sup>3</sup>	1.8×10 <sup>7</sup>	2.2×10 <sup>7</sup>	9.5×10 <sup>-5</sup>
Rts 1×S	2.4×10 <sup>2</sup>	1.2×10 <sup>7</sup>	3.4×10 <sup>7</sup>	2.0×10 <sup>-5</sup>

表 5 Col 因子の伝達

Temp.	Col → R	Colony 数 (W3630)	Col <sup>+</sup> Colony		Col type (数)		
			数	%	Ib	E <sub>1</sub>	Ib+E <sub>1</sub>
37 °C	Ib E <sub>1</sub> Ib+E <sub>1</sub> R <sup>-</sup>	100	5	5	5	—	—
		100	1	1	—	—	—
		100	17	17	8	—	—
	Ib E <sub>1</sub> Ib+E <sub>1</sub> R <sub>100</sub>	100	16	16	16	—	—
		100	14	14	—	14	—
		100	9	9	—	1	3
	Ib E <sub>1</sub> Ib+E <sub>1</sub> R <sub>100-1</sub>	50	4	8	4	—	—
		8	1	12.5	—	1	—
		38	18	47	2	—	16
	Ib E <sub>1</sub> Ib+E <sub>1</sub> NR 73	100	11	11	11	—	—
		50	23	46	—	23	—
		100	15	15	8	—	3
25 °C	Ib E <sub>1</sub> Ib+E <sub>1</sub> R <sup>-</sup>	100	5	5	5	—	—
		100	1	1	—	1	—
		50	16	32	9	—	7
	Ib E <sub>1</sub> Ib+E <sub>1</sub> Rts 1	100	0	0	—	—	—
		50	0	0	—	—	—
		100	35	35	2	5	19

より促進されるようであるが、R<sub>100</sub> や NR 73 の場合  
にくらべて著明でない (表 4)。

Col 因子を持つ細胞を Doner とし R 因子を持つ細胞

を Recipient とした時の Col 因子の伝達実験の結果で  
は、Col 因子の伝達率には、受容菌のもつ R 因子によ  
る著名な影響をもたない様である (表 5)。

いづれにしても R 因子を持つ細胞を Doner とし、Col 因子を持つ細胞を Recipient とした場合、又逆の場合にも、それぞれの因子の伝達に強い干渉が認められることはなく、各々の組合せで R 因子と Col 因子の共存する伝達株が得られる。

⊙ E. Coli W3110 : Col<sup>+</sup>に R 因子を伝達させて得られた株 W3110 : Col<sup>+</sup> ; R<sup>+</sup>を薬剤平板で継代し、薬剤を含まない broth 中で一代培養後、その耐性マーカーを調べたが、fi<sup>+</sup>, fi<sup>-</sup>型 R 因子共に安定に存在する

表 6 伝達した直後の R 因子の安定性

R→Col	Colony 数 (W3110)	R <sup>+</sup> Colony 数	
R <sub>100</sub> ×	S	114	114
	Ib	115	115
	E <sub>1</sub>	117	115
	Ib+E <sub>1</sub>	117	117
R <sub>100-1</sub> ×	S	118	118
	Ib	125	125
	E <sub>1</sub>	132	132
	Ib+E <sub>1</sub>	128	128
NR 73 ×	S	107	107
	Ib	116	116
	E <sub>1</sub>	97	97
	Ib+E <sub>1</sub>	125	125
Rts 1 ×	S	104	104
	Ib	101	101
	E <sub>1</sub>	125	121
	Ib+E <sub>1</sub>	58	58

(表 6)。

⊙ E. Coli W3110 : Col<sup>+</sup> ; R<sup>+</sup>, E. Coli W3630 : R<sup>+</sup> ; Col<sup>+</sup>株について3ヶ月、半流動培地中に穿刺保存後 broth 中で18時間培養後両因子の安定性を調べた結果は、Col 因子を持つ細胞に R 因子が移った場合には、その Col 因子は安定であり R 因子によって排除される事はないことが知られた。重感染した R 因子については、R<sub>100</sub> 及び R<sub>100</sub> 由来の mutant である fi<sup>-</sup>型 R 因子は R<sub>100</sub>-1 安定で Col 因子と共存するが、NR 73, Rts 1 は不安定で高率に排除された (表 7)。

R 因子をもつ受容菌に種々の Col 因子を重感染させた場合は、R<sub>100</sub>, Col Ib, NR 73 と Col E<sub>1</sub>, Rts 1 と Col Ib+E<sub>1</sub> の組合せにおいてそれぞれの Col 因子は不安定で高率に除去され、又 R 因子の側から見ると、R<sub>100</sub> と Col E<sub>1</sub>, Col Ib+E<sub>1</sub>, R<sub>100</sub> と E<sub>1</sub>, NR 73 と Ib+E<sub>1</sub>, Rts 1 と Ib+E<sub>1</sub> の組み合わせでそれぞれの R 因子が追出された結果が得られた (表 8)。

#### 4) 考 察

fi<sup>-</sup>型 R 因子, fi<sup>+</sup>型 R 因子共に、Recipient がどの Col 因子を持っていても伝達頻度の低下はない。むしろ R<sub>100</sub> (fi<sup>+</sup>) の伝達頻度は recipient が Col Ib を持っていることにより、又、NR 73 (fi<sup>-</sup>) のそれは recipient が Col Ib 又は E<sub>1</sub> を持つことにより 100~10 倍に上昇するこの現象が吉川<sup>6)</sup>のすでに明らかにした R 因子間の伝達に関する facilitation と同じかどうかは いまだ検討されていないが、いづれにしても 2 つの episome 又は plasmid 間の相互関係として興味深い。Col 因子と R 因子の共存性についていえば、Col 因子を持った細胞に R 因子が重感染した場合、I-like 因子である NR 73 が Ib 及び E<sub>1</sub> に

表 7 継代後の Col 因子と R 因子の安定性

菌 株	コリシン産生能			薬 剤 耐 性					
	検査コロニー数	Ib	E <sub>1</sub>	検査コロニー数	KM	CM	SM	TC	SA
E. coli : Ib ; R <sub>100</sub>	50	50	0	50		50	50	50	50
E. coli : Ib ; R <sub>100-1</sub>	50	50	0	41		41	41	41	41
W3110 : Ib ; NR 73	50	50	0	50			50	49	50
W3110 : Ib ; Rts 1	50	50	0	50	50				
E. coli : E <sub>1</sub> ; R <sub>100</sub>	50	0	50	50		50	50	50	50
E. coli : E <sub>1</sub> ; R <sub>100-1</sub>	50	0	50	50		50	50	50	50
W3110 : E <sub>1</sub> ; NR 73	50	0	50	46			39	39	41
W3110 : E <sub>1</sub> ; Rts 1	50	0	50	50	0				
E. coli : Ib+E <sub>1</sub> ; R <sub>100</sub>	50	50	50	50		50	50	50	50
E. coli : Ib+E <sub>1</sub> ; R <sub>100-1</sub>	50	50	50	50		50	50	50	50
W3110 : Ib+E <sub>1</sub> ; NR 73	50	50	50	50				48	50
W3110 : Ib+E <sub>1</sub> ; Rts 1	50	50	50	50	0				

表 8 継代後の Col 因子と R 因子の安定性

菌 株	コリシン産生能			薬 剤 耐 性					
	検査コロニー数	Ib	E <sub>1</sub>	検査コロニー数	KM	CM	SM	TC	SA
<i>E. coli</i> : R <sub>100</sub> ; Ib	50	0	0	32		0	30	16	30
W3630 : R <sub>100</sub> ; E <sub>1</sub>	50	0	50	50		0	0	0	0
: R <sub>100</sub> ; Ib+E <sub>1</sub>	50	50	50	50		0	0	0	0
<i>E. coli</i> : R <sub>100-1</sub> ; Ib	50	50	50	50		0	49	49	49
W3630 : R <sub>100-1</sub> ; E <sub>1</sub>	50	50	50	50		0	0	0	0
: R <sub>100-1</sub> ;	50	50	50	50		40	40	44	40
<i>E. coli</i> : NR 73 ; E <sub>1</sub>	50	0	0	50			50	50	50
W3630 : NR 73 ; Ib+E <sub>1</sub>	50	50	50	50			0	0	0
<i>E. coli</i> : Rts 1 ; Ib+E <sub>1</sub>	50	0	0	50	0				
W3630									

よって低率ながら排除され、Rts 1 は E<sub>1</sub> によって高率に脱落することがわかった。又、R 因子を持つ recipient に Col 因子を重感染された時は R 因子は全体的に不安定化するが、とくに E<sub>1</sub> により R<sub>100</sub> が、Ib により NR 73 が、Ib と E<sub>1</sub> により Rts 1 が不安定となり高率に脱落する結果が得られた。今後同一細胞中に共存する両因子の再伝達、他の Col 因子と R 因子の相互関係を検討する予定である。

本研究は、昭和44年11月12日、13日に開催された第24回日本細菌学会関東支部総会に発表された。

参 考 文 献

1) Harada, K., Kameda, M., Suzuki, M., Kakinuma, Y., and Mitsunashi, S. : Gunma J. Med. Sci., 10 : 201, 1961.

2) Watanabe, T., Nishida, H., Ogata, C., Arai, T., and Sato, S. : J. Bacteriol., 88 : 716, 1964.  
 3) 宮崎瑤子, 芦田博之, 岡田正二郎 (1969) 自然界より分離された Col1a, Col 1b の相互関係, 日本細菌学雑誌 : 24 : 506~507.  
 4) 渡辺 力, 新井俊彦 (1968) R 因子による宿主菌のコリシンおよび紫外線に対する感受性の変化について, 日本細菌学雑誌 23 : 271~272.  
 5) 芦田博之, 宮崎瑤子, 岡田正次郎 (1970) fi<sup>-</sup> 因子と Col I 因子との相互関係, 日本細菌学雑誌 : 25, 45.  
 6) M. Yoshikawa, K. Sakai (1970) Facilitation of the Transfer of R Factor by the Resident R Factor. J. Bacteriol. 102 : 285~287.