

Edwardsiella tardaファージ ET-1の形態学的,
化学的, 生態生理学的性質について

雨村明倫・花浦良彦・沖増英治・藤田昌也

福山大学内海生物資源研究所

Morphological, Chemical and Ecophysiological Properties
of Bacteriophage ET-1 Infectious to Edwardsiella
tarda.

Akinori Amemura, Yoshihiko Hanaura, Eiji Okimasu and
Masaya Fujita

(Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama
University, Ohama-cho, Innoshima, Hiroshima 722-21)
Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama
Univ., No. 3, 31-45 (1992).

The bacteriophage ET-1 infectious to Edwardsiella
tarda FM-9009, which causes edwardsiellosis in fish, was
studied for the morphology by electron microscopy, DNA
and protein sizes and interaction with the host bacte-
rium in natural aquatic environments.

ET-1 morphologically similar to Escherichia coli
 λ and T5 phages had a polyhedral head 60-70 nm in diam-
eter, and a non-contactile, bent tail without a sheath
which was 150-170 nm in length and 10-13 nm in width.

ET-1 DNA was digested with restriction endonuclease
BamHI into 7 fragments with 0.31-12.2 kb, which were
shown by agarose and polyacrylamide gel electrophoresis,
and the molecular size of the ET-1 DNA was estimated to

be 29.9 kb.

Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate revealed that ET-1 contained two major proteins with 27 and 40 kDa and minor proteins of more than 10 kinds.

The adsorption of ET-1 onto the host cells was impaired at host cell-phage densities equal to or lower than 10^6 cfu/ml - 10^5 pfu/ml. Salt concentrations and nutritional conditions did not affect significantly to the adsorption, indicating the adsorption to occur effectively in natural aquatic habitats. On the other hand, the replication of ET-1 was impaired in starved cells or in normal cells in sea water, but recovered the replication activity slowly when the cells were transferred to nutritional environments. Application of phage for prevention of fish disease in fish farm ponds was discussed on the basis of the finding in this study.

水圏には多くのバクテリオファージが存在することが知られており¹⁾, バクテリオファージは原核生物の遺伝的変換やポピュレーションコントロールを行っているのみならず, 水中における物質の循環や水の浄化に役立つとされている。最近, 活性汚泥, 河川などの水圏においてファージと宿主細菌がどのようなバランスのもとに存在しているか, どのような頻度でファージ感染が起こるかということを考察している生態学的研究が見られる²⁻⁴⁾。しかし, ファージと宿主との関係についての研究は, 従来, 栄養が豊富で, 高い宿主細胞・ファージ密度をもつ試験管内での感染実験がほとんどであり, 低栄養下で, 低い密度状態にある自然環境下においてビルレント・ファージがどのように宿主を攻撃し, また宿主と共存しているかなどの研究はほとんど見られない。

雨村ら⁵⁾は以前, ウナギ養殖場からウナギのパラコロ病の病原菌である *Edwardsiella tarda* を溶菌するバクテリオファージ ET-1 を分離し, その宿主特異性や吸着・増殖条件について

検討を行った。E. tardaは Enterobacteriaceaeに属するグラム陰性のかん菌で、ウナギのみならずマダイ、チダイ、ティラピア、ボラなど淡水や海水の養殖魚にエドワードジェラ感染症を引き起こし養殖漁業におそれられている。養殖魚の疾病の予防・治療へのファージの応用については、ファージあるいは宿主が変異を起こし感染しなくなるなどの問題があり、必ずしも応用は容易ではないと思われる。しかしファージの生態学的研究や変異などについての基礎的研究を進めることにより、将来養殖場の水環境の改善、疾病予防へのファージの応用の道が開けるものと考えられる。

本研究では電子顕微鏡によって ET-1 の形態学観察を行い、DNA やタンパク質の性質を検討すると共に、自然環境下における宿主への吸着や増殖について検討を行った。

実験材料および方法

ファージ試料：本研究では E. tarda FM-9009に感染するファージとして石垣養魚場（三重県鈴鹿市）のウナギ養殖池から分離した ET-1⁵⁾を用いた。

使用細菌株：本実験では石垣養魚場でパラコロ病のウナギより分離した E. tarda FM-9009⁵⁾を用いた。

使用培地：供試菌株の培養、ファージの調製、希釈には通常食塩 1%を加えた BHI培地（Brain Heart Infusion, Difco Lab.）(pH 7.4)を使用した。BHI培地はすでに 0.5%の食塩を含んでいるので、1%食塩を加えた BHI培地は 1.5%の食塩を含むことになる。そこで 1%食塩添加 BHI培地を以下 1.5%食塩 BHI培地と記す。またファージの調製、計測に用いた BHI軟寒天培地、BHI寒天培地は BHI培地に寒天をそれぞれ 0.5%、1.5%を加えて作成した。

ファージの調製法：ファージ液の調製は二層寒天平板法により行った^{5,6)}。Confluent lysisにより得られたファージ液を 2% (w/v) 酢酸アンモニウムで抽出し、その溶液を遠心分離 (12,000 x g, 15 min, 15°C) にかけて、0.2 μm のナイロンフィルター (Corning Glass Works) を通すことにより混入する細菌の細胞

破片を取り除いた。ファージ粒子を遠心分離 (37,000 x g, 1 hr, 4°C) することにより集め, 2%(w/v) 酢酸アンモニウムで二度洗浄した後, 少量の同溶液に懸濁して 4°C で保存した。顕微鏡観察にはこのファージ液をそのまま使用した。また吸着実験および一段増殖実験には, この液を 1.5% 食塩 BHI 培地で適当に希釈して用いた。

ファージ数の測定法: ファージ数の測定は二層寒天平板法で行った^{5,6)}。1.5% 食塩 BHI 培地で適当に希釈したファージ液 0.1 ml に, 予め一夜 1.5% 食塩 BHI 培地で 30°C で培養した *E. tarda* FM-9009 (10^8 cfu/ml) 0.1 ml 及び 1.5% 食塩 BHI 軟寒天培地 3 ml を混合し, その混合液を予め調製しておいた 1.5% 食塩 BHI 寒天平板の上に流し込み 30°C で一夜培養した。プレート上に形成されたプラークを計測してプラーク形成単位 (pfu/ml) として算出した。

電子顕微鏡観察: 2%(w/v) 酢酸アンモニウム中のファージ試料 (10^{11} pfu/ml) に同容量の 1%(w/v) オスミウム酸溶液 (Kellenberger 緩衝液⁷⁾, pH 6.0, に溶かしたものを加えることによりファージを固定した。固定試料を, 炭素蒸着させたコージオン膜で覆ったマイクログリッド (150メッシュ, 応研商事) 上にのせ, Kellenberger 緩衝液に溶かした 0.5%(w/v) 酢酸ウラン (和光純薬) で洗浄した後, 2%(w/v) の酢酸ウラン水溶液でネガティブ染色を行った。染色試料は日立 H-7000 電子顕微鏡を用い 75 kV で, 15,000 倍あるいは 30,000 倍の倍率で観察した。

ファージ DNA の調製: 溶菌によって混入の可能性のある細菌由来の DNA を除くために, 前もってファージ試料を DNase I で処理した後, Maniatis et al.⁸⁾ の方法によりファージ DNA を調製した。

ファージ DNA の電気泳動: 制限酵素は東洋紡から購入した。ファージ DNA を制限酵素で消化した後, 1% アガロースゲルおよび 5% ポリアクリルアミド・ゲルを用いて 100 V で電気泳動を行った。

ファージタンパク質の電気泳動: ファージ試料を 70 mM トリス-塩酸 (pH 6.8), 11.2% (v/v) グリセロール, 3% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 0.1% (w/v) ブロモフェノール・ブル

ー, 5% (v/v) β -メルカプトエタノールを含む溶液と混合し100°Cで30分間加熱した後, SDSを含む10%ポリアクリルアミド・ゲルを用いて100Vで電気泳動を行った。

ファージ吸着におよぼす細菌およびファージ密度の影響: 一夜培養した *E. tarda* の培養液 9 ml (1.5%食塩 BHI培地で 10^8 - 10^4 cfu/mlとなるように希釈, 30°Cに保温) と ET-1 1 ml (10^8 - 10^4 pfu/mlとなるように1.5%食塩 BHI培地で希釈, 30°Cに保温) を混合し, 30°Cでインキュベートした (multiplicity of infection, m.o.i., = 0.1)。10, 20, 30分後に1 mlを取り出し, 直ちにフィルター (0.45 μ m, Millipore HV) で濾過した後, 濾液に含まれる細菌への未吸着ファージ数を測定した。濾過前と濾過後のファージ数より吸着率を計算した。

ファージ吸着に及ぼす種々な溶液の影響: 一夜培養した *E. tarda* FM-9009 の培養液 (2×10^9 cfu/ml) 1 mlを1.5%食塩 BHI培地, 海水, 蒸留水あるいは水道水で希釈し, それぞれ 10^8 cfu/mlの濃度になるように四種類の細胞懸濁液を調製した。30°Cに保温した9 mlの細胞懸濁液に30°Cに保温したファージ液1 ml (10^8 pfu/ml) を混合し (m.o.i. = 0.1), 上記の方法に従って吸着率の測定を行った。

一段増殖実験: (1) 増殖細胞; 一夜培養した *E. tarda* FM-9009の培養液 0.9 ml (10^8 cfu/ml, 30°Cに保温) とファージ液 0.1 ml (10^8 pfu/ml, 30°Cに保温) とを混合し (m.o.i. = 0.1), 30°Cにインキュベートし吸着を開始した。30分後にその混合液 0.1 ml をとり, 30°Cに保温した1.5%食塩 BHI培地 9.9 mlを加え希釈した (希釈液)。その希釈液 0.15 mlを30°Cに保温した1.5%食塩 BHI培地 14.85 mlに加えインキュベートを続けた (増殖液)。希釈液の一部は直ちにフィルター (0.4 μ m) で濾過し, 濾液の未吸着ファージ数を測定し, 吸着率を計算した。増殖液は一定時間毎にサンプリングしてファージ数を測定した。別の実験では希釈液および増殖液の調製にあたって, 1.5%食塩 BHI培地の代わりに海水を用いた。

(2) 飢餓細胞; 一夜培養した *E. tarda* FM-9009 の培養液 (2×10^9 cfu/ml) 1 mlを100 mlのフラスコにとり, 海水 19 mlを加えた後, 30°Cで15時間振とう培養を続けた。得られた飢餓培養液 0.9 ml (10^8 cfu/mlに相当) にファージ液 0.1 ml

(10^8 pfu/ml) を加え (m.o.i. = 0.1), 増殖細胞で行った方法と同じ方法でファージの吸着および増殖実験を行った。

(3) 海水中での一段増殖実験; 上記の増殖細胞および飢餓細胞 0.9 ml (10^8 pfu/ml) にファージ液 0.1 ml (10^8 pfu/ml) を加え (m.o.i. = 0.1), 30°C で 30 分間インキュベートした。その後, その混合液 0.1 ml をとり 9.9 ml の海水で希釈した (希釈液)。この希釈液 0.15 ml を 30°C に保温した海水 14.85 ml に加えインキュベートを続けた (増殖液)。増殖液は一定時間毎にサンプリングしてファージ数を測定した。

結果および考察

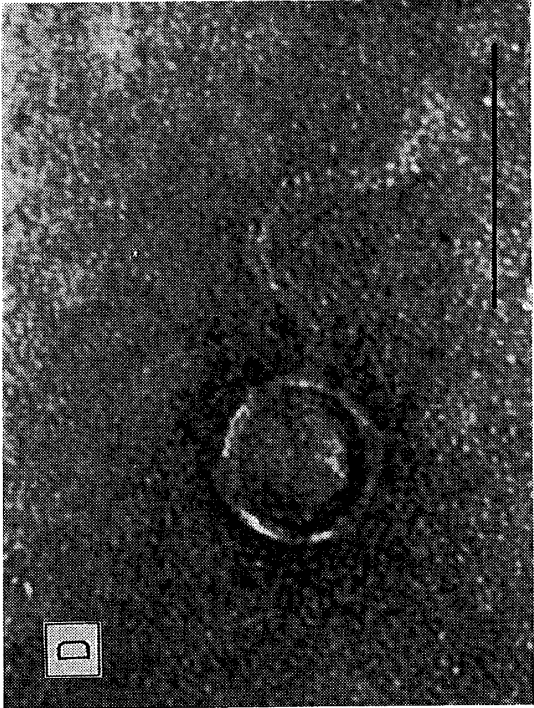
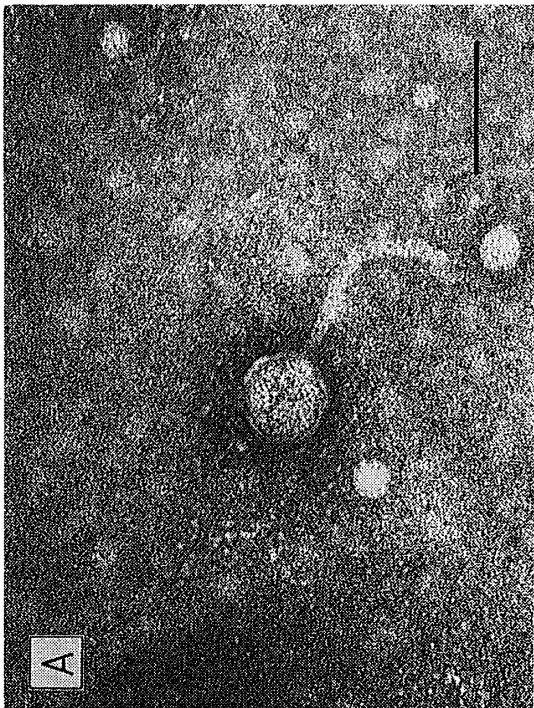
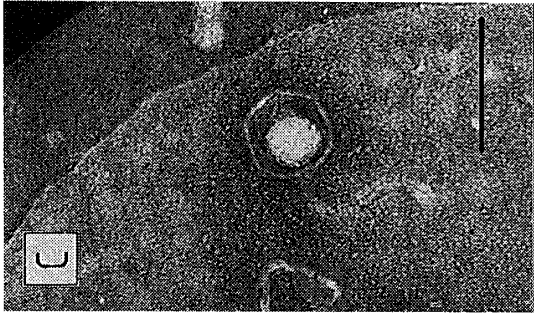
1. ファージ ET-1 の形態学的性質並びに DNA, タンパク質について

ファージの形態: ファージ ET-1 粒子の電子顕微鏡写真を Fig. 1 に示した。

ET-1 の頭部は外観が六角形の多面体であり, 直径は 60-70 nm であった。尾部は長さが 150-170 nm と長く, 幾分曲がっており, 尾鞘は見られず, 基部のプレート構造も明瞭ではなかった。また尾部の幅は 10-13 nm であった。Fig. 1E は宿主細胞表面に ET-1 が吸着している写真であり, 細胞に対して加えるファージの数を多くする (m.o.i. = 10) とこのように細胞あたり多くのファージが吸着しているのが観察された。

ファージの形態は多様であるが, Bradley⁹⁾ により 6 つのグループ (A-F) に分類されている。この分類によると, 多面体の頭部と長い非収縮性の尾部を持ち, 後述するように二重鎖の DNA を持つ ET-1 はグループ B に入る。形態学的には *Escherichia coli* の λ ファージや T5 ファージに類似している。日高・藤村¹⁰⁾ は収縮性の尾鞘を持つファージは持たないものに対して, クロロフォルムや熱に耐性であると述べているが, ET-1 は尾鞘を持たずクロロフォルム, 熱にたいして感受性が高い⁵⁾ ことから, やはりこの傾向があてはまる。

ファージ DNA 分子の大きさ: 精製した ET-1 DNA を制限酵素 EcoRI, BamHI, HindIII で処理し, 得られた DNA 断片を 1% アガ



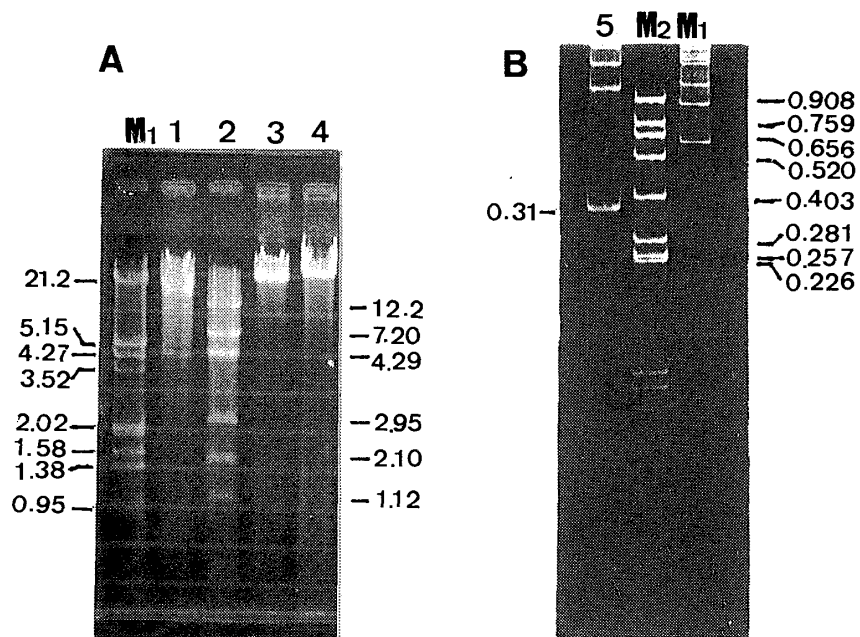


Fig. 2. Patterns of subfragments after restriction enzyme digestion of ET-1 DNA. A: 1% agarose gel. B: 5% polyacrylamide gel. The ET-1 DNA was digested with EcoRI (lane 1), BamHI (lanes 2 and 5) or HindIII (lane 3). Lane 4 contains native ET-1 DNA. Sizes of marker DNAs (lanes M1 and M2) and the subfragments obtained are given in kilobase pairs (kb).

Fig. 1. Electron micrographs of ET-1 negatively stained with aqueous 2% uranyl acetate. A-C: x 150,000. D, E: x 300,000. Bars represent 100 nm.

コースを用いた電気泳動で分離した。Fig. 2Aに示されるように ET-1 DNAは BamHIで切断され、12.2, 7.20, 4.29, 2.95, 2.10, 1.12 kb の断片を生じた。理由は分からないが、ET-1 DNAは EcoRI, HindIIIではほとんど分解されなかった。BamHIによる分解物をさらに 5%ポリアクリルアミド・ゲルを用いた電気泳動にかけ低分子量の断片を調べると新たに 0.31 kbの断片が見いだされた (Fig. 2B)。このようにET-1 DNAは、BamHIによって 7つの断片に切断され、これらの断片のサイズから計算すると、29.9 kbの分子サイズを持つことが推測された。λファージの 48.5 kbと比べるとかなり小さいことが分かった。また ET-1 DNAは BamHIで切断されることから二重鎖であることは明かである。

ファージタンパク質の分子量：ファージ試料をSDS-ポリアクリルアミド・ゲルを用いた電気泳動を行い、クーマシー・ブリリアント・ブルーで染色すると、Fig. 3Aに示されるように 40 kDaと 28 kDaの2つの主要バンドが見られた。銀染色によりさらに10数本のバンドが検出された (Fig. 3B)。これらのタンパク質の分子種分布は Bグループの他のファージのものと類似している¹¹⁾。

2. ファージ感染におよぼす宿主細胞の環境条件

ファージ吸着におよぼす宿主・ファージ密度および水環境の影響：自然環境下におけるファージの感染・増殖を調べるため、まず宿主細胞およびファージの密度を低くした場合のファージ吸着率を検討した。E. tarda FM-9009 の細胞密度を 10^8 , 10^6 , 10^5 , 10^4 cfu/mlとし、ファージ密度がその 1/10となるように 1.5%食塩BHI培地中で両者を混合した (m.o.i = 0.1)。その結果は、Fig. 4 に示すように細胞密度が 10^8 cfu/mlでは 30分で 70%のファージが吸着されたが、 10^6 cfu/mlでは 30分での吸着率が 10%以下と著しく低下した。細胞密度がそれ以下に低下した場合吸着率はさらに低下すると思われるが実験誤差の範囲になるためその値を読むことは困難であった。E. tarda は鞭毛をもち運動性を有するが細胞・ファージ密度の減少により両者が遭遇する頻度は低くなり、従って自然界において細菌がピルレント・ファージに感染される確率は非常に低いと推測される。

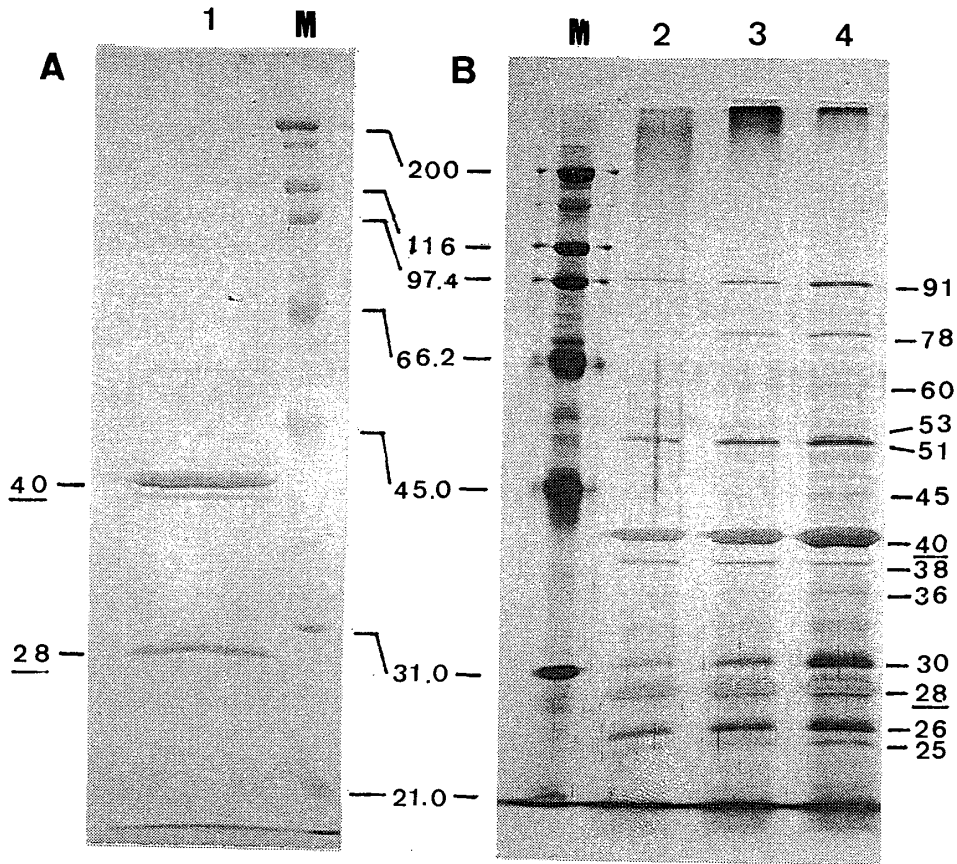


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of structural proteins of ET-1. Purified phage was disrupted by boiling in sample buffer, and loaded on 10% SDS-polyacrylamide gel. A: Coomassie brilliant blue staining. B. Silver staining. Lanes 1-4 contain 5×10^8 , 0.8×10^8 , 2×10^8 , and 5×10^8 pfu phages, respectively. Lane M contains marker proteins; sizes are given in kilodaltons (kDa). Sizes of ET-1 proteins are also indicated; Two major proteins are underlined.

次に宿主細胞密度を 10^8 cfu/ml, ファージ密度を 10^7 pfu/ml に保ち, 種々の水環境での吸着率を検討した。Fig. 5に示すように, 30分での吸着は 1.5%食塩BHI培地中での吸着が一番よく (70%), 海水, 水道水, 蒸留水中ではやや低下 (50 - 60%) するものの, 特に大きな差は見られなかった。さきにET-1のBHI培地中での吸着率におよぼす食塩濃度の影響を調べたところ, 食塩濃度 2.5%ぐらいまではそれほど吸着への影響は見られなかったが, 3.5%になるとやや低下した⁵⁾。これらの結果を総合的に考えると塩濃度や栄養条件はファージ吸着にはそれほど大きな影響を与えないと思われる。

飢餓細胞へのファージ感染: ET-1の宿主細胞への吸着は周囲の栄養条件によってさほど影響を受けないことが分かったが, ファージの増殖は宿主細胞の生理的条件, 栄養環境によって大きく左右され, 宿主の増殖能力に依存しているとされている¹²⁾。自然水圏に存在する細菌の多くは貧栄養の環境下で増殖がおさえられた状態にあり, その生理状態は必ずしも正常な状態ではない。われわれの実験では *E. tarda* FM-9009を 15時間海水中で飢餓状態にさせた場合, ファージ ET-1の宿主細胞への吸着力は損なわれることはなかった。また飢餓状態にさせた細胞とさせなかった細胞を海水中でファージ感染を行ったところ, 共にファージの増殖はまったく見られなかった (Fig. 6A)。飢餓状態にさせた細胞に感染したファージは時間と共に徐々に不活性化した。このようにファージの増殖は宿主細胞が増殖できる環境にあることが必要であると思われる。

次に宿主細胞を飢餓状態にさせ, ファージを海水中で吸着させた後, 1.5%食塩BHI培地で一段増殖実験を行うと Fig. 6Cに示すように, 約1時間の潜伏期間の後ファージは徐々に増殖しはじめた。溶菌がどの程度起こるか, 細胞あたりのファージ放出量がどの位であったかについては特に検討しなかったが, ファージの増殖は宿主細胞の増殖とほぼ平行した。一方, 飢餓させない細胞については Fig. 6Bに示すように 45分の潜伏期間の後細胞一つ当たり 58個のファージを放出した。このように飢餓細胞に感染したファージはその後栄養状態が回復してもファージの増殖はすぐには正常に戻らないが, 細胞が増殖するにつれてファージの増殖が起こることがわかった。

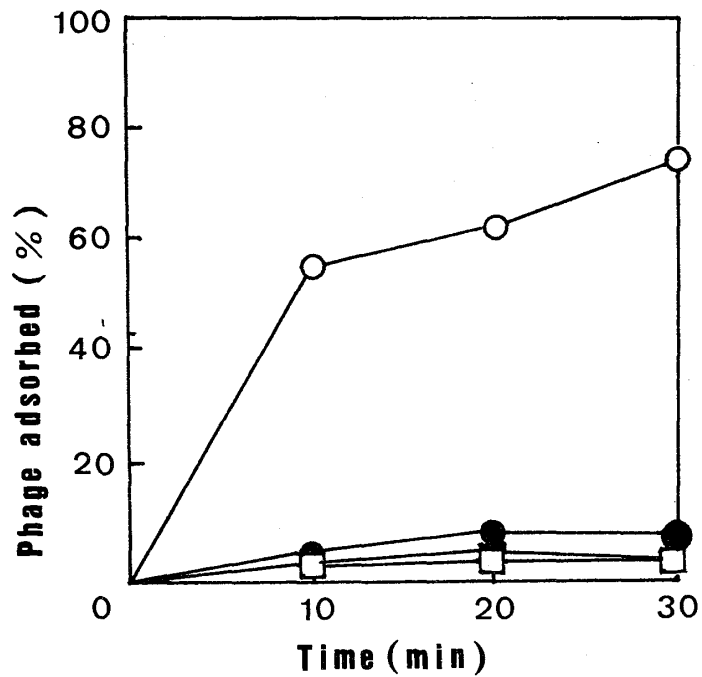


Fig. 4. Effects of cell-phage densities on ET-1 adsorption. Densities: ○, 10⁸ cfu/ml (10⁷ pfu/ml); ●, 10⁶ cfu/ml (10⁵ pfu/ml); □, 10⁵ cfu/ml (10⁴ pfu/ml); ■, 10⁴ cfu/ml (10³ pfu/ml).

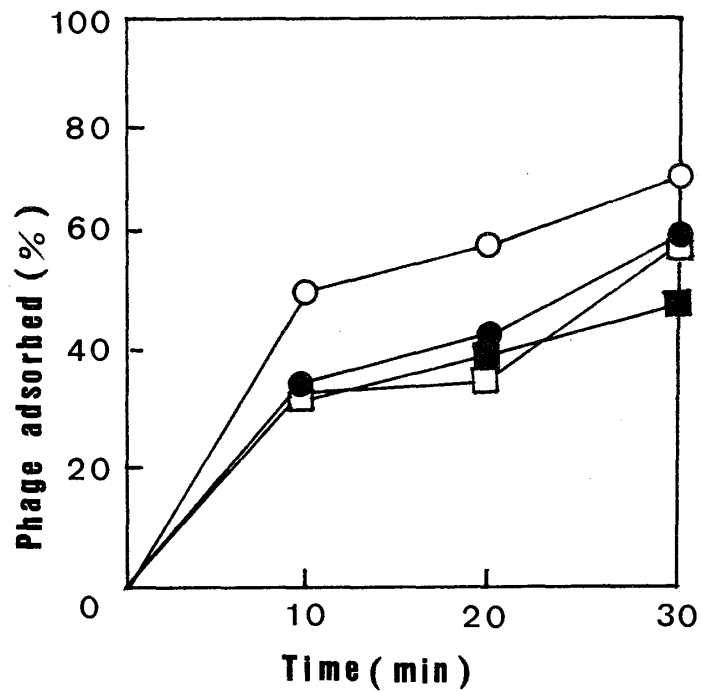


Fig. 5. Effects of several solutions on ET-1 adsorption. Solutions: ○, 1.5% NaCl BHI medium; ●, sea water; □, distilled water; ■, tap water.

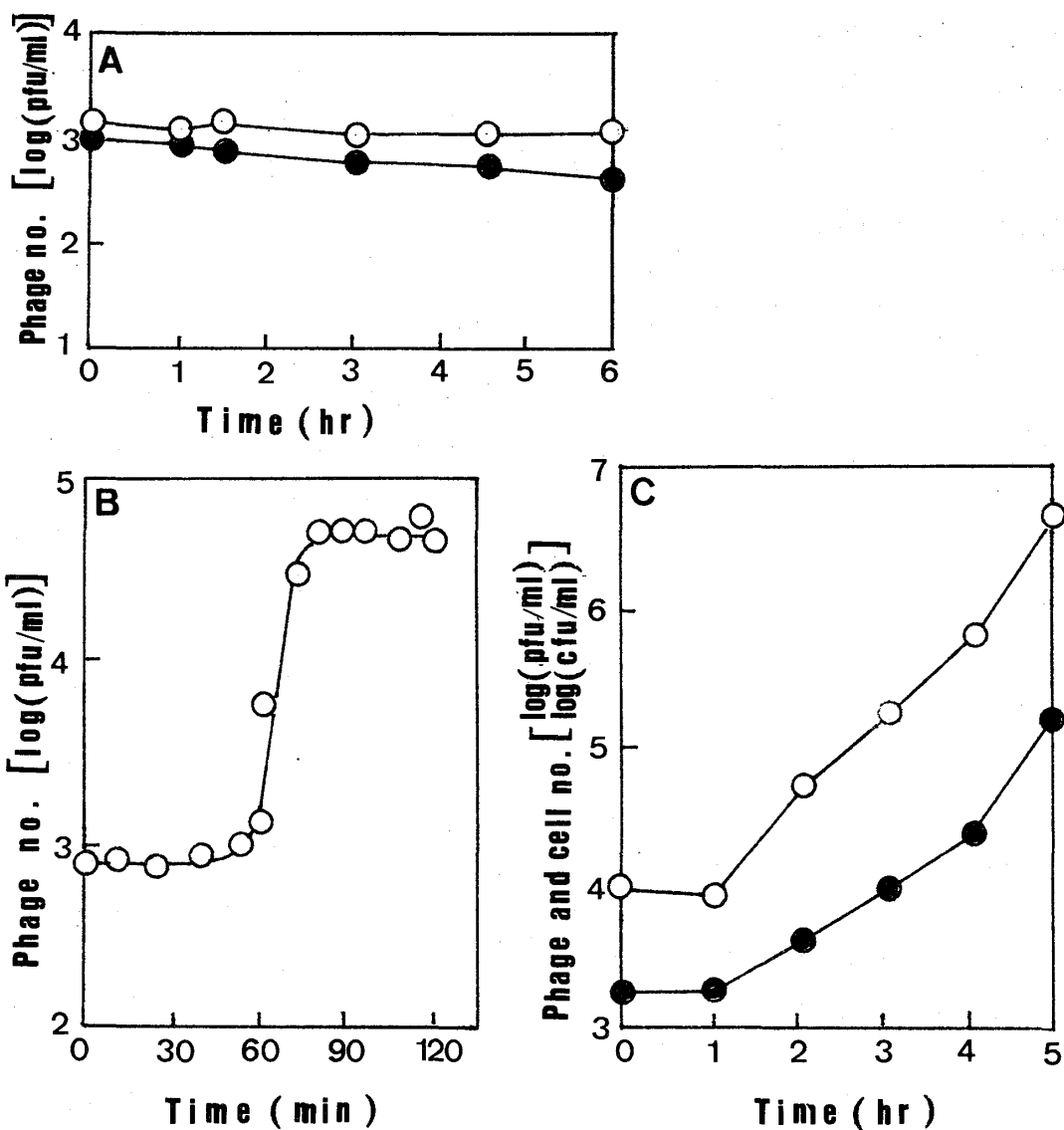


Fig. 6. One-step growth curves of ET-1. Phage was mixed with cells at m. o. i. = 0.1 (10^8 cfu/ml, 10^7 pfu/ml), and allowed to be adsorbed to cells for 30 min, and one-step growth was examined as described in Methods. (A) ET-1 was infected into growing cells (○) and starved cells (●) in sea water. (B) ET-1 was infected into growing cells in 1.5% NaCl BHI medium. (C) ET-1 was infected into starved cells in 1.5% NaCl BHI medium and cell and phage growth were monitored.

飢餓細胞に海水中でファージを吸着させ、さらに4時間海水中に保ったのち1.5%食塩BHI培地に移すと、4時間海水中に保たれなかったものに比べ、ややファージの増殖は遅れるが細胞の増殖に伴ってファージも増殖しはじめた。

養魚池の魚病細菌をファージによって溶菌させる場合、まず細菌・ファージの密度が相当高くないと両者が遭遇する頻度が低くて効果的ではない。細菌が増殖していなければファージは感染しても増殖せず、恐らく溶菌も起こさないとと思われる。周囲の栄養条件が良くなり細菌の増殖が活発になるとファージの増殖も起こり溶菌が活発となる。しかし両者の比が適当でないとファージの攻撃を受けない細菌が増殖するので魚病発生を抑えることは出来ない。いずれにせよファージは高い濃度で投与する必要がある。

要 約

魚病細菌 *E. tarda* FM-9009を溶菌するファージ ET-1の電子顕微鏡による形態学的観察、電気泳動によるDNAの分子サイズおよび構成タンパク質の分子量の測定、また種々の環境下における感染・増殖実験を行った。

ET-1の頭部は直径60-70 nmの多面体で、尾部は幅10-13 nm、長さ150-170 nmでやや湾曲しており、収縮性の尾鞘や明瞭な基部プレート構造を持っていない。基本的には大腸菌のλファージやT5ファージに類似した形態を有している。

ET-1のDNAは制限酵素 *Bam*HIで7つの断片に切断され、これらの断片のサイズから計算するとDNAの大きさは29.9 kbであった。またET-1は40 kDa、28 kDaの2つの主要タンパク質の他、10数個のタンパク質より構成されていることが分かった。

宿主細胞密度が 10^6 cfu/ml、ファージ密度が 10^5 pfu/ml以下になるとET-1の細胞への吸着速度が著しく低下した。また塩濃度や栄養条件によって吸着速度はそれほど影響を受けなかったが、宿主細胞が貧栄養下で増殖が抑えられている環境下ではファージは複製しないが、栄養状態が回復すると細胞の増殖に伴って徐々にファージは複製を始めることが分かった。これ

らの知見をもとに養魚場におけるファージの魚病感染予防への応用について考察を行った。

文 献

- 1) L. M. Proctor and J. A. Fuhrman : Nature, **343**, 60-12 (1990).
- 2) L. L. Daniels and A. C. Wais: Appl. Environm. Microbiol., **56**, 3605-3608 (1990).
- 3) T. A. Kokjohn, G. S. Saylor and R. V. Miller: J. Gen. Microbiol., **137**, 661-666 (1991).
- 4) J. Hantula, A. Kurki, P. Vuoriranta and D. H. Bamford : Appl. Environm. Microbiol., **57**, 2147-2151 (1991).
- 5) 雨村明倫・服部 博・沖増英治・松本正樹・小畑晶博：福山大学内海研報, **2**, 11-22 (1991).
- 6) 富沢純一：バクテリオファージの実験, 岩波書店 (1970).
- 7) 電子顕微鏡生物試料作成法：日本電子顕微鏡学会関東支部編, 丸善, pp. 61-62 (1986).
- 8) T. Maniatis, E. F. Frisch and J. Sambrook: Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982).
- 9) D. E. Bradley: Bacteriol. Rev., **31**, 230-234 (1967).
- 10) 日高富男・藤村 剛：鹿大水産紀要, **20**, 141-154(1967).
- 11) P. Forsman and T. Alatossava: Appl. Environm. Microbiol., **57**, 1805-1812 (1991).