

Title	Pseudomonas aeruginosa L型菌とEscherichia coli L型菌との異属間細胞融合
Author(s)	黒野, 眞澄
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/34970
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

【6】

氏名・(本籍)	くろ の ま すみ 黒 野 真 澄
学位の種類	歯 学 博 士
学位記番号	第 7 0 5 2 号
学位授与の日付	昭 和 60 年 12 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> L 型菌と <i>Escherichia coli</i> L 型菌との 異属間細胞融合
論文審査委員	(主査) 教 授 小 谷 尚 三 (副査) 教 授 鈴木不二男 教 授 岡 田 宏 助 教 授 齋 藤 喜 八 助 教 授 零 石 聡

論 文 内 容 の 要 旨

動物細胞における異種細胞間でのハイブリッド細胞の形成は、1965年岡田善雄博士らにより、博士ら自身が世界に先駆けて発見したHVJ (Sendai Virus) を用いる細胞融合法を利用して、ヒト由来のKB細胞とマウス由来のEhrlich 腹水ガン細胞との組み合わせで観察された。以来、数多くの研究が相継ぎ、現在では体細胞遺伝学という新しい学問分野が確立され、ヒトの種々の遺伝子の染色体における局在を明らかにする有力な研究手段として役だっている。また植物細胞では品種改良への応用が期待され、またハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体の作製は免疫学の進展に大きく寄与している。

さて微生物では、動植物と同じく真核細胞である真菌については1976以来、種間ハイブリッド形成に関するいくつかの報告がある。また原核細胞である細菌でも、放線菌間あるいはブドウ球菌間で種間ハイブリッドの研究がみられるが、異属間のハイブリッド形成の報告は皆無である。本研究では、*Pseudomonas aeruginosa* L型菌と *Escherichia coli* L型菌を用いて、異属間で細胞融合によるハイブリッドが得られるかどうかを検討した。

P. aeruginosa (IFO 3455) のL型菌, Ps-L株 (北里研究所の本間遜博士より恵与された) はストレプトマイシン (SM) には2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上, カナマイシン (KM) には160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の耐性を示す株である。一方この研究でPs-Lのパートナーとした *E. coli* (Otani) のL型菌, Ec-L株は横浜市大・医学部の田所一郎博士より恵与されたテトラサイクリン耐性株(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を当研究室で50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで耐性を上昇させて実験に供した。細胞融合法は次のようにして行なった。Ps-L株では2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のSM, Ec-L株では50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のTCを含む液状の基礎培地 (Difco 社製のBrain Heart Infusion Broth に4.5%の食塩を添加して高張としたもの) に500単位/ ml のペニ

シリリングを加えた培地に37°Cで一夜培養した供試菌を1 ml (約 10^9 cell を含む) ずつ混ぜ合わせ、 $5,000 \times g$ で10分間遠心して得た菌体を基礎培地で1回遠心洗浄した。この二種の菌体の混合物にポリエチレングリコール (PEG) 6,000 溶液 [4.5%食塩加リン酸塩緩衝液に50% (w/v) となるように溶解したもの] の1 mlを加え、Thermo-Mixer で攪拌した後37°Cで5分間反応させた。反応物を $12,000 \times g$ で20分間遠心した後、PEG をできるだけ除き、得られた沈渣全体を500単位/mlのペニシリリングを含む基礎培地の10 mlに移し、37°Cで増菌培養した (一部の試験では実施せず)。培養液を基礎培地で適度に希釈し、その1 mlずつを基礎培地に $1,000 \mu\text{g} / \text{ml}$ のSMと $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ のTCの両薬剤を加えた3枚1群の検定用培地、ならびにそれぞれの薬剤を単独で加えたもの、および両薬剤をともに加えない対照培地 (いずれも寒天を0.8%添加した) に常法にしたがって混積培養した。出現した集落数を培養7日後に数えた。

SM耐性 *P. aeruginosa* のL型菌, Ps-L (Sm^r) とTC耐性 *E. coli* のL型菌, Ec-L (Tc^r) とを混合してPEG処理し、SMおよびTCに対する二重薬剤耐性集落の出現を指標として、属を異にするL型菌間で細胞融合が起こるかどうかを調べた。両薬剤に耐性を示す集落が、PEG未処理の対照実験におけるその180~370倍にあたる高頻度で出現することを認めた。ちなみに、Ps-L (Sm^r) あるいはEc-L (Tc^r) をそれぞれ単独でPEG処理した場合には、突然変異率を越える頻度での両薬剤に耐性の集落の出現は見られなかった。細胞融合のための反応系および増菌培地の両方にDNaseを添加しても、二重耐性集落の出現頻度は影響されなかった。また、Ps-L (Sm^r) あるいはEc-L (Tc^r) の一方を浸透圧ショックで破裂させ、得られたL型菌溶解物と他方のL型生菌とを混合してPEG処理した場合には、二重耐性集落はほとんど認められなかった。次にPs-L (Sm^r) あるいはEc-L (Tc^r) の一方をPEGで処理した後、メンブレンフィルターを通過させて得た濾液でパートナーとしたL型生菌を処理した場合には、二重耐性集落はほとんど出現しなかった。さらに、Ps-L (Sm^r) とEc-L (Tc^r) とを別々にPEG処理した後、PEGをとり除き、両者を混合して増菌培養をした場合にも、二重耐性集落の出現はほとんど認められなかった。一方、PEG処理時の温度を0°Cにした場合にも、37°Cでの処理と同様な頻度で二重耐性集落が出現した。なお、Ps-L (Sm^r) とEc-L (Tc^r) を混合してPEG処理した場合に認められる二重耐性集落の出現には増菌培養は必ずしも必要ではなかった。しかし増菌培養を行なうと時間経過に従って二重耐性を示す菌数が漸増した。

以上の実験成績から、Ps-L (Sm^r) とEc-L (Tc^r) とを同時にPEG処理することにより得られる二重耐性菌は、PEG処理によって誘導された細胞融合に結果するものと結論される。

論文の審査結果の要旨

異種細胞間におけるハイブリッド細胞の形成は、細胞融合の発見者である岡田善雄博士により、1965年、ヒト由来およびマウス由来の細胞間で始めて記載された。

黒野眞澄君は、通常の細菌細胞とは異なり、細胞融合の妨げとなる細胞壁を保有することなく生育し

得る *Pseudomonas aeruginosa* L型菌と *Escherichia coli* の L型菌とを組み合わせ、薬剤耐性をマーカーならびに細胞融合体の選択に利用することにより、属を異にする細菌種間での細胞融合に世界で始めて成功した。

この業績は、細菌遺伝学の今後の進展に新しい局面を開く可能性を秘めたものであり、歯学博士の学位請求に十分値するものと判定した。