

いまだき？いまこそ！プラークアッセイ

—新奇ジャンボファージ取得のためのプラークアッセイのすゝめ—

川崎 健*・山田 隆

バクテリオファージ（ファージ，細菌ウイルスとも呼ばれる）発見の報告は，1915年にTwort（ブドウ球菌ファージ），1917年にd'Herelle（赤痢菌ファージ）によってなされ，以来100年にわたってさまざまな細菌に感染する多様なファージの単離，研究が熱心に行われてきた。ファージの単離方法として主に用いられてきたのはプラークアッセイ法である。前半ではこの方法およびプラークの形成メカニズム（広がり方，サイズの大小，数の変化など）について解説する。

また，長年にわたり世界中で単離，解析が行われてきたにもかかわらず2000年以降，まったく新しいジャンボファージ（ゲノムサイズが200 kbp以上の巨大なファージでgiant phageとも呼ばれる¹⁾）が多数発見されるようになってきた²⁻⁶⁾。これらのファージは特別な環境で採取された試料から得られたわけではない，スクリーニングの際の小さな工夫の積み重ねによって取得できるようになってきたのである。後半では，いままで検出が難しかったジャンボファージに対応できるプラークアッセイ法を紹介する。

プラークアッセイ法とは

自身で増殖できる生物と異なり，ファージは宿主が存在しないと増殖できない。そこでファージの単離，検出には宿主が必要となる。単離方法としては，ファージ希釈液を宿主培養液に加え培養する限界希釈法なども存在するが，もっとも一般的に行われてきたのはプラークアッセイ法である。この方法では，宿主とファージを軟寒天培地に懸濁し，寒天培地上に広げ，透明な溶菌した領域（溶菌斑，プラーク）を作らせることでファージの存在を検出できる。この一般的なプラークアッセイ法について，方法とプラーク形成のメカニズムを解説する。

<材料（9 cmシャーレの場合）>

- ・ 寒天培地：培地に1～1.5%程度の寒天を加え，オートクレーブ後，シャーレに流し入れ固化させる。液量は20 ml程度。
- ・ 軟寒天培地（トッパアガー，ソフトアガーとも呼ばれ

る。本稿では以下トッパアガーと呼ぶ）：プレート培地と同じ培地に0.5～0.7%程度の寒天を加え，加熱，溶解させた後，試験管に分注しオートクレーブ滅菌。液量は4～5 ml程度。

- ・ 宿主
- ・ ファージ液

<方法>

1. トッパアガーを湯煎にし，完全に溶かした後，保温（60℃）しておく。
2. ファージを宿主に感染させる。
3. トッパアガーが固まらない，かつ菌体が死なない温度まで冷まし，菌体とファージを加え，寒天培地上に広げ固める。
4. 静置培養後，観察する。

<各ステップの解説（コツ）>

1. 微小なゲルの粒子が溶け残るとプラークが観察しづらくなる。完全に溶けたように見えてからさらに5分程度加熱し確実に溶かす。また「3」のステップで手早く広げられるように48℃程度での保温を推奨しているプロトコルもあるが，ゲル化温度は寒天の種類や濃度，培地成分によって異なるため固まることもある。余裕を持った温度が良い。
2. 静置してファージを宿主に吸着させるステップを設ける場合が多い。宿主の倍加時間の1/6程度で行い，ファージの増殖速度に応じて調整する。
3. 菌体の熱に対する耐性は異なる。極端に熱に弱い場合は工夫が必要。この段階では宿主の細胞密度は低いプレートは透明である。
4. 最初のファージが，宿主に感染し（図1-A），増殖する（図1-B）。溶菌後，ファージはトッパアガーの中を**拡散によって移動**し，次の宿主に感染（図1-C），増殖する（図1-D）。ファージが感染→増殖→拡散→感染……と繰り返す間，未感染の宿主は増殖し続ける（図1-A, B, C, D）。

細菌が十分育った領域は不透明になり，一方，細菌がファージによって溶菌された領域は透明となる。この区

*著者紹介 広島大学大学院先端物質科学研究科（助教） E-mail: takeru@hiroshima-u.ac.jp

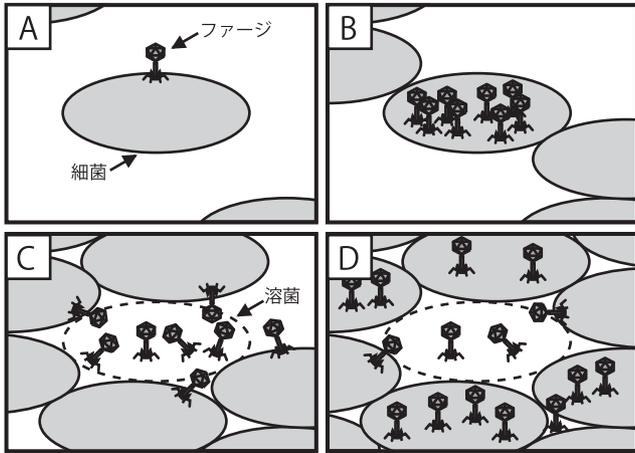


図1. ファージの感染→増殖→拡散の繰り返しによるプラーク形成のイメージ。細菌、ファージともに時間経過に伴って増殖する(A→D)。

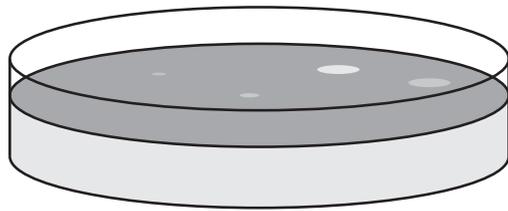


図2. トップアガー層におけるプラークの断面図と実際に観察されるプラークのイメージ。トップアガー層を貫通できない小さなプラークや、大きくても濁ったプラークは観察が難しい。

別がつくようになったものが(裸眼で観察できる)プラークである。

プラークの見た目は「円」だが、実際には「球」である。トップアガーの層を突き抜けないサイズのもののは検出が難しい(図2-A, B, C)。たとえば、9 cm シャーレの場合、内径は84 mm程度なので、面積は55 cm²程度であり、トップアガーが5 mlのとき、厚みは1 mm程度にもなることから、直径が1 mm未満のプラークの検出は難しい場合がある(検出の難易度は菌体と溶菌部分のコントラストの強さに依存する)。また、感染しない、あるいは感染しても死なない細胞がある程度の比率で存在すると、濁ったプラークになりコントラストが低下する。この場合も検出が難しくなる(図2-E)。

プラークサイズの違いについて

ところで、プラークは一定のサイズではなく、同一のファージ、プレートにおいても大きなプラークや小さな

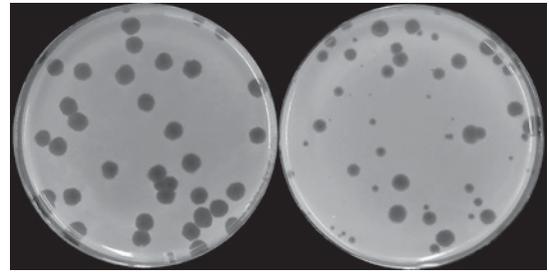


図3. 同じファージでも宿主によって現れるプラーク形状は大きく異なる。青枯病菌M4S株(左)、MAFF730138株(右)。ファージはともにMAFF730138株で増殖させたRSB1。左のプレートのプラークサイズは比較的揃っているが右のプレートでは大小さまざまである。右のプレートに現れた大きなプラーク、小さなプラークをそれぞれ単離し、再びMAFF730138株でプラークアッセイを行っても、やはりさまざまなサイズのプラークが現れる。

プラークが現れる(図3)。これは宿主に感染したファージすべてが同様に感染・増殖し、放出されるわけではないことに因る。

感染するステージや条件によって感染率や増殖効率は異なる。分裂した直後の宿主細胞と分裂直前の宿主細胞では、感染サイクル後に一つの細胞から放出されるファージ数は当然異なる。また宿主の免疫機構(制限酵素、感染細胞の自殺など)に打ち勝てる頻度も異なる。したがって宿主のコンディションによって現れるプラーク数も異なる。つまりサイズがさまざまなだけでなく、現れるプラーク数さえもさまざまである。

ファージ液の濃度を「pfu(プラークフォーミングユニット)/ml」と表現するが、同じファージ液でも、宿主の種類、コンディションなどによりpfuは異なってくることに注意が必要である(pfusはプラーク形成能を有するファージ粒子のみを反映するため、実際にその液体にどれだけの粒子が存在しているかは分からない)。

安定的に感染でき、また、増殖サイクルの早いファージのプラークサイズはそろいやすいが、宿主のコンディションにより感染の効率が変わりやすいファージや増殖サイクルが遅いファージのプラークサイズはさまざまになりやすい。さらに、最近新たに報告されたBREXと呼ばれるファージ耐性メカニズム⁷⁾(ファージゲノムの積極的な分解を伴わない、ファージの感染サイクルを押しさえ込むシステム)の場合はその宿主株における1回目の感染サイクルが完了するまでの時間に大きな差が生じるためプラークサイズに顕著な差が現れる(BREXではメチル化による自己と非自己の認識を行うため、一度増殖に成功すれば2サイクル目以降の感染は遅延なく進行する)。

プラークサイズはどこまで大きくなるか？

プラークアッセイを行ったプレートを経時的に観察すると、プラークのサイズは徐々に広がるが限界があり、どこかで停止する。なぜプラークサイズの拡大はストップするのか？この答えはある意味当たり前で、ファージは宿主に設計図を打ち込み宿主のエネルギーを利用して増殖していることから、宿主の生命活動がとまると増殖できなくなる。

つまり、プラークサイズがどこまで大きくなるかは、宿主が休眠するまでの時間と、ファージの増殖・拡散速度の勝負ともいえる。

発見報告の続くさまざまなジャンボファージ

2000年以降になってからまったく新しいタイプのジャンボファージが相次いで発見されはじめている。なぜ近年になるまでほとんど知られなかったジャンボファージが急に単離されるようになったのだろうか？

そこにはスクリーニングの際に行われる工夫が二点存在する。

まず一点目は、単純な話としてフィルターの高サイズの選択である。一般的に濾過滅菌は0.2 μmポアのフィルターで行うことが多いが、このポアサイズではジャンボファージは通り抜けることができなかつたり、通り抜ける効率が悪かつたりして検出されにくかつた。

次に二点目として、今までとは少し異なるプラークアッセイの条件が必要だつた。大きいファージは増殖の遅い(サイクルが遅く、バーストサイズも小さい)例が多く、また、拡散速度も遅いことから、一般的に小さなプラークしか作れない。

もし、目に見えないくらい小さなプラークしか作れないとすれば検出も難しい。逆にいえば、見えないものを見えるようにしてやれば見逃してきたものを発見できる。

ジャンボファージ検出用のプラークアッセイ法

ではどうすれば弱いプラーク形成能しか持たないファージを検出できるのだろうか？

プラークの検出しやすさに影響を与える要素は、コントラスト比、宿主の生育可能時間、ファージの増殖速度(吸着率、感染効率、感染サイクルの速度、バーストサイズ)、ファージ粒子の拡散速度などがあることを前半で述べた。これらについて改善を行うことで検出が可能となる。その具体的な方法を述べる。

1. プラークの視認性をあげる

A トップアガアの量を減らす

B トップアガーに色素などを入れる

1-A トップアガアの量を減らせばプラークが形成される上層の厚みが減り、小さなプラークでも検出できる場合がある。うまくいけば針で突いた程度の小さなプラークが検出できる。非常に小さいので注意が必要である。

1-B 色素などを添加しコントラストをあげることでプラークの視認性を改善できることがある。ただし、添加する色素とファージ、宿主の組合せにより効果は異なるため注意が必要である。たとえば、古典的に用いられてきたテトラゾリウムレッドではプラーク数が減少してしまう例も報告されている⁸⁾。

2. 宿主の生育可能時間を延長する

A 使用する宿主の量を減らす

B 生育が遅い培地に変更する

2-A トップアガーに入れる宿主の量を減らせば、宿主密度が限界に達するまでの時間が長くなるため、生育時間を延ばすことができる。しかし、あまり宿主の投入量を少なくすると不均一になり、逆にプラークの観察が難しくなる。

2-B 貧栄養培地を用いることで生育速度を遅くすることができる。また抗生物質を少量添加し生育速度を低下させる方法もある。このとき菌が適度に弱り抵抗力が低下すれば、副次的にプラーク数も増える⁹⁾。ただし、抗生物質により宿主の挙動が不安定になることや、溶原化ファージが刺激され誘発されることもあるため注意が必要である。特に野生株にはプロファージが溶原化していたりトランスポゾンが存在していたりすることが多いため問題が起こりやすい。通常は溶原化ファージが誘発されてもimmunity(溶原化したファージは自己の遺伝子発現を抑えるためにリプレッサータンパク質を生産する。これを蓄積した菌体は同一あるいは非常に近縁のファージに対して耐性を示す。これをimmunityあるいは免疫と呼ぶ)によりプラークは観察されないが制御領域の壊れたsuperinfective(多重感染可能型)ファージが生じることもある。

3. 拡散速度を速くする

寒天の濃度を下げることで拡散速度を上げれば大きなプラークが観察できる¹⁰⁾。

トップアガアの寒天濃度を0.2~0.4%程度に下げることで大きく拡散速度をあげるができる。ただし寒天濃度を下げすぎるとバクテリアの運動性やゲルからの離水によってプラークが滲むことがある。またゲル強度が低下するため、プラークアッセイを行ったプレートを

裏返せなくなったり、上層がメンブレンに付着してしまうことからプラークハイブリダイゼーションができなくなったりするなどの問題も生じる。同じ寒天濃度でも寒天の種類や培地濃度によってゲル強度は異なることに注意が必要である。

4 (2+3). 培養温度を下げる

宿主の生育速度とファージの増殖・拡散速度の比が重要なため、温度を変えることが効果的なこともある。宿主の生育速度とファージの増殖速度に対する温度の影響は株によってそれぞれ異なるが、一般的には培養温度を下げると生育や増殖速度は大きく低下する一方で、拡散速度はそれほど影響を受けないため温度を下げた方がプラークは大きくなることが多い。ただし観察に時間がかかる。

これらの方法の中で、経験的には寒天の濃度を下げ拡散速度を速くする「3」がもっとも安定的かつ効果的に利用できる。

ところで、すべてのジャンボファージが小さなプラークを呈するわけではない。粒子が大きく拡散速度が低くても溶菌活性が高く、増殖速度が速く、バーストサイズが大きいファージならばプラークが観察できることもある。あるいはゲノムサイズ（すなわちヘッドサイズ）が大きくてもテールが短ければ拡散速度の低下は少なく済むためプラークは検出しやすくなる。

逆にプラークを小さくしたいときには？

プラークが大きすぎて扱いにくいファージも存在する。たとえば青枯病菌ファージRSB1とRSB2（ともにT7様のPodovirus、溶菌活性が強くテールは短い）はプラークサイズの直径が15 mmを越えることがあり、ファージ濃度の測定が行いにくい。ファージの濃度を測定するには通常100倍希釈刻み程度で希釈液を作りプラークアッセイを行うが、このプラークサイズの場合、数十個もプラークが現れるとプラークがつながり合ってしまう数えられなくなる。また、宿主が十分に増える前にプレート一面にファージが広がってしまうことからプレートライセート法でのファージ増殖効率もきわめて悪くなる。

この場合にはどうすれば良いだろうか？

これは簡単で、今までと逆のことをすれば良い。とはいえ、寒天濃度が高いと高温で固まってしまうためゲルの濃度はそれほど上げられない。小さくしたい場合は宿主の量を増やすことがもっとも容易な方法であろう。前述のRSB1ファージの場合、宿主の量を20倍にすること

でプラークの直径を15 mm → 3 mmにできる。

最後に

近年、ジャンボファージ発見の報告が世界で相次いでいるが、国内からの報告は少なく、日本でも巨大なファージについての研究が進展することを期待し有効なプラークアッセイ法を紹介させていただいた。

ジャンボファージは大きなゲノムを持つことから一般的なファージと比べ感染サイクルも遅く、一度の感染で増殖できる粒子数も少ない。それにも関わらず自然界に存在し続けていることから何らかの増殖に有利な形質を持つと思われる。たとえば、耐性菌が生まれにくくファージセラピーやファージを用いたバイオコントロールに効果的な例も報告されている¹¹⁾。また大きなゲノムには今までのファージでは知られていない遺伝子が多くコードされ、新しい遺伝子のソースとしても期待できる。さらに巨大な粒子には、学術的に興味深い新しい特殊な構造も存在することが報告されている^{12,13)}。ジャンボファージに興味を持たれた方はぜひ単離に挑戦していただきたい。今までと同じ方法では、今までと類似したファージしか単離できないが、少し条件を変えるだけで新しい物がまだまだ見つかると思われる。

また、スクリーニングの対象を変えるのも効果的と思われる。たとえば、低温菌や超好熱菌、嫌気性菌からのスクリーニングは有望であろうと予想される。これらの菌に対するプラークアッセイ法も存在はしているが、適応できる温度範囲が狭かったり、操作が煩雑だったりすることから、好気性の中温菌ファージに比するほどの単離は試みられていないのが実情である。いくつかの工夫は必要となるが、未開拓な対象でのスクリーニングは新種のファージ発見への近道となろう。

文 献

- 1) Hendrix, R. W.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **328**, 229 (2009).
- 2) Mesyanzhinov, V. V. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **317**, 1 (2002).
- 3) Yamada, T. *et al.*: *Virology*, **398**, 135 (2010).
- 4) Šimoliūnas, E. *et al.*: *J. Virol.*, **86**, 5406 (2012).
- 5) Kim, M. S. *et al.*: *Arch Virol.*, **158**, 2399 (2013).
- 6) Drulis-Kawa, Z. *et al.*: *Arch Virol.*, **159**, 567 (2014).
- 7) Goldfarb, T. *et al.*: *EMBO J.*, **34**, 169 (2015).
- 8) Hurst, C. J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3462 (1994).
- 9) Santos, S. B. *et al.*: *BMC Microbiol.*, **9**, 148 (2009).
- 10) Serwer, P. *et al.*: *Virol. J.*, **4**, 21 (2007).
- 11) Fujiwara, A. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 4155 (2011).
- 12) Wu, W. *et al.*: *Science*, **335**, 182 (2013).
- 13) Effantin, G. *et al.*: *Structure*, **21**, 298 (2013).