

第 48 回 総 会 特 別 講 演

ミ コ バ ク テ リ ア の 性 と 遺 伝

徳 永 徹

(共同研究者) 水 口 康 雄

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 48 年 7 月 19 日

The 48th Annual Meeting Special Lecture

SEXUALITY AND THE GENETICS IN MYCOBACTERIA*

Tohru TOKUNAGA and Yasuo MIZUGUCHI

(Received for Publication July 19, 1973)

Infection of bacteria with deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from bacteriophages, that is called "transfection", was found in *Mycobacterium smegmatis* in 1963⁷⁾. Evidence for showing that DNA but not any phage particles contaminated in the DNA samples produces infective centers was presented as follows: (1) the infectivity was destroyed completely by catalytic amounts of DNase, (2) phage anti-serum did not reduce number of plaque-forming units, (3) Tween 80, which prevents phage adsorption, did not prevent the infection, (4) a phage-resistant mutant of the host was infected by the sample, (5) host cells in a late log phase of the growth were competent for the infection (Fig. 2)^{5) 6) 15)}.

Since it was known in *Bacillus subtilis*, *Pneumococcus* and *Haemophilus* that cells competent for transfection are also competent for genetic transformation, the phenomenon of transfection found in *Mycobacteria* has been widely studied by many investigators from the standpoint of genetic transformation^{1) 2)}. For instance, we found that glycine has capacity to sensitize mycobacterial cells not only for the induction of cell lysis by lysozyme but also for the transfection (Fig. 3)^{52)~54)}. These observations were expanded from glycine to various d-type amino acids³⁵⁾. Based on these knowledges, we devised a new, gentle method for isolating DNA from amino acid-sensitized mycobacteria with lysozyme and phenol (Fig. 4)¹⁹⁾. Employing the amino acid-sensitized cells competent for transfection and DNA isolated gently from various strains of *Mycobacteria*, experiments aiming at genetic transformation were carried out. However all attempts have been ended in negative results.

Apparently, mycobacterial cells have ability to uptake DNA³²⁾ and have dark-repair system for UV-damaged DNA²⁰⁾. As described later, they also have intracellular mechanisms of recombining bacterial DNA with their chromosomes^{25) 27)}. The reason why mycobacterial cells competent for transfection can not be transformed with bacterial DNA has not yet been clear; we assume that they might lack ability to recover after possible DNA uptake and recombinative events.

Transduction with mycobacteriophage was reported by Ramakrishnan and his co-

* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

workers using phage 13 and *M. smegmatis* strain SN2³⁹). We confirmed their results and added some positive data using additional genetic markers (Table 2). Attempts for obtaining transducing phages other than phage 13, however, were all failed.

In 1970, genetic recombination was demonstrated in *M. smegmatis*²⁵). Crosses between nutritionally complementary auxotrophs derived from one strain were infertile whereas those from different strains formed recombinants (Fig. 6, Table 4 and 5). Conjugation rather than transformation and transduction was suggested as the gene transfer mechanism. Backcrosses of recombinants by either parental strain indicated four different types of mating behavior, suggesting that the mycobacterial compatibilities are controlled by at least two different factors (Table 7)²⁶) 27).

Sexual conjugation rather than cell fusion was proposed as the zygote-formation mechanism, based on the following facts: (1) analysis of segregation of unselected markers in recombinant progeny obtained in various cross systems revealed that one particular parent contributes the majority of alleles in nearly all of the recombinants, (2) mating medium containing streptomycin (SM) prevented recombination when one particular parent was SM resistant and another was sensitive, but it did not prevent recombination when the former parent was SM-sensitive and the latter was resistant (Table 6)²⁷), and (3) crosses were infertile when one particular parent was recombination-deficient mutant (*rec*⁻) and another was not (*rec*⁺), but crosses were fertile when the former strain was *rec*⁺ and the latter was *rec*⁻ (unpublished data).

Results of interstrain crosses in many strains of *M. smegmatis* showed that these strains can be separable into five groups in their mating behaviors (Fig. 7). Although such a multiple mating system has not been reported in any bacteria, we feel some analogy in phage-host relationship; one cell has various kinds of phage receptor on its surface and one phage particle has capacity to adsorb and inject its DNA into various kinds of cells. For example, D4 phage receptor of *M. smegmatis* was found to be a peptidoglycolipid, mycoside C⁴⁷), and the bacterial cells should have at least fifteen different kinds of receptor structure on the cell surfaces⁴⁸). In a similar way, those cells might possibly possess various kinds of sex structures on the surfaces.

Electron microscopic searches lead us to a finding of mycobacterial organella on cell surface, "pili-like structure" (Fig. 8). This structure was detected in *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* (H37Ra) and *M. bovis* (BCG) (unpublished data). It is observable only in cells grown on solid agar media. Recombinant formation was not occurred when mating was carried out at 42 C (unpublished data), but formation of the pili-like structure was observed at 42 C. Correlation between the sexual conjugation and the formation of pili-like structure is unknown yet.

Efforts to construct linkage maps for the markers employed failed because of ordering ambiguity²⁷). Recently, however, a part of the genetic map was succeeded to obtain from crosses between drug resistant strains of *M. smegmatis* (strain Rabinowitchi and PM5). It is indicated in Fig. 10 (unpublished data). These genes controlling resistance for viomycin (VM), kanamycin (KM) and SM were all "ribosomal genes" (K. Masuda and T. Yamada: personal communication). However no linkage was detected between both VM- and KM- genes and SM-gene.

The sexual conjugation found in *Mycobacteria* seems to be very unique in the mode of zygote formation and gene transfer as described. In part, it resembles to enterobacteria, partly to *Nocardia* and partly to some fungi. Further studies on the mycobacterial conjugation are in progress with an expectation to contribute for not

only mycobacteriology but also general bacteriology with its uniqueness.

No conjugation system has been found yet in the mycobacterial species other than *M. smegmatis*; in order to analyze "virulence" or drug resistance of *M. tuberculosis*, finding of that in the bacterium is required.

I. はじめに

結核菌学の輝かしい歴史は、R. Koch による結核菌純培養の成功以来、すでに一世に垂んとしている。その間、結核菌の培養性状、病原性、化学療法剤とその耐性、菌体成分とその活性など、結核病と特に深いつながりがある諸問題には、多くの研究者の努力が集中され、幾多の優れた業績が報告されてきた。一方このような結核菌の重要な性質はすべて、菌によって遺伝的にコントロールされているものであるから、結核菌の遺伝学もまた、ずいぶん古くから多くの学者の関心を集めてきた。

このような結核菌の遺伝に関する知識の集積が、国際的に1つのピークに達したとみられるのが、第20回国際結核病学会主催の「ミコバクテリア遺伝学の最近の進歩」と題するシンポジウム (New York, 1969)¹⁾ と、ロヨラ大学主催の「ミコバクテリア、ノカルディア、アクチノミセスにおける宿主ウイルス関係」と題する国際シンポジウム (Chicago, 1969)²⁾ とであったろう。ここでは、その年までにミコバクテリア遺伝学が到達した最高のレベルについて多くの知見が交換されたが、しかし I. C. Gunsalus が指摘したように、それは多くの面で厚いベールに覆われ、将来の展望もまた定かではないようにみえた。私どももこの学問の前途が大きな難関に阻まれている思いを抱いて帰国したのであった。

具体的にその難関とは、1つにはミコバクテリアという細菌に特有な取り扱いの難しさ(たとえば、発育がおそく、栄養要求が比較的複雑であり、菌塊を作って発育し、また菌体破壊が容易でないなど)を意味するが、もう1つの難関は、他の細菌で知られているような確実な遺伝子伝達の系が全く見出されぬために、近代的な遺伝解析の方法がないということであった。

顧みると、私どもがこの20年ほどの間、一貫して目指してきた課題もまた、この点にあったといえよう。すなわち、この取り扱いが厄介なミコバクテリアという細菌にあくまで固執しつつ、この種属において遺伝子伝達の系を発見、確立することであった。そのことは、結核菌の薬剤耐性、病原性、菌体成分などの研究に遺伝学的アプローチをするた

めには、最初の不可欠なステップであると信ぜられた。

上述の国際シンポジウムの翌年、私どもはミコバクテリアで性的接合による遺伝子伝達の系を発見できたが、この系を用いての研究はなお日が浅く、上述のような結核病とも関連がある分野へのアプローチはいまだに全く将来の問題として残されている。しかし最初の関門を通り抜けて、これまで他の細菌では知られなかったミコバクテリア独特の遺伝の仕組みが次々に明らかになってきた。

本日は、遺伝学の専門用語などは極力避け、私どもの研究がどのように進んできたか、どこまでが明らかになり、どこがわからないでいるか、というストーリーを中心に話を進めたいと思うが、それでも難解な用語が多過ぎたり、あるいは逆に平易に過ぎたりする点があると思われるので、あらかじめご容赦をいただきたい。

II. ミコバクテリアの遺伝物質

細菌細胞は2分裂により増殖するが、その子孫はどれだけ分裂を繰返しても親の細菌の基本的性質を失わない。このことが遺伝ということの本質であろうが、この遺伝をコントロールしている物質は、細胞の核の中のDNAである。DNAは二重らせん構造をもち、そのうえにアデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)という4種類の塩基が並んでいるが、すべての生物の遺伝情報は、最小のウイルスから人間に至るまで、この4種類の塩基の並び方の順序と、その鎖の長さによって規定されている。

ミコバクテリアの遺伝物質もその例外でないが、その

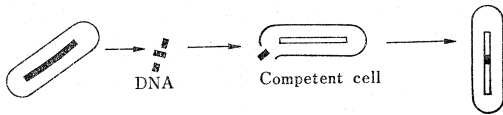
Table 1. DNA Composition of Mycobacteria and Mycobacteriophages³⁾⁶⁾¹⁵⁾

DNA	Base proportions (mole %)				Density CsCl (g/cm ⁻³)	T _m (C) ^o
	A	T	G	C		
ATCC9624	17	17	33	33	1.725	94.7
ATCC607	16	16	34	34	1.726	94.2
ATCC9033	16	16	34	34	1.726	94.8
D4	18	18	32	32	1.722	92.7
D28	20	20	30	30	1.719	92.5
D29	18	18	32	32	1.723	92.4
D32	16	16	34	34	1.727	94.8
B1	—	—	—	—	1.728	92.0
HC	17.2	16.0	33.4	33.4	—	—

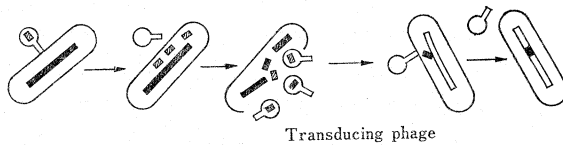
特色の1つは、DNA 中の GC の含量が大変高いことである。表1にミコバクテリアとそのファージの DNA の塩基組成について、私どもの成績を示した³⁾⁶⁾¹⁵⁾。高等動物細胞の GC 比は約 40% であるが、ミコバクテリアのそれは 60% を大きく上回るものが多く、すべての生物中最高の部類に属する。この点からもミコバクテリアは、遺伝的にきわめて風変りな生物であるということができよう。

Fig. 1. Intercellular Gene-transfer in Bacteria

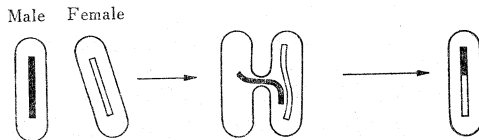
1. Transformation



2. Transduction



3. Conjugation



1' Transfection

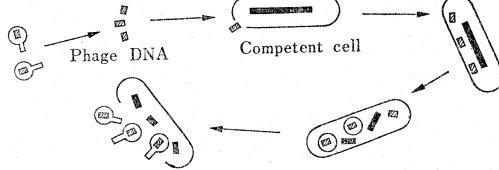
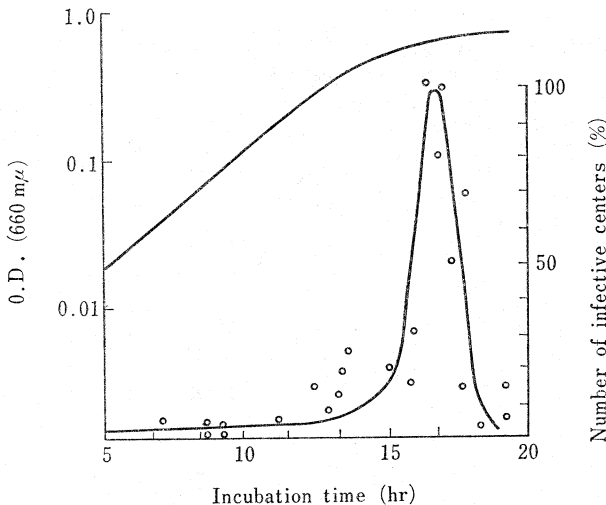


Fig. 2. Growth Curve of Mycobacterium (ATCC 607) and its Susceptibility to B1 DNA Infection



III. ミコバクテリアのトランスフェクション

遺伝学材料として細菌は種々有利な性質をもっているが、その1つに遺伝物質を細胞から細胞へと伝達させるという性質があり、その性質を利用して、微生物遺伝学だけでなく、すべての生物の遺伝学に大きな貢献を果たしてきた。その遺伝物質伝達の形式は大別して、図1に示すように、transformation (形質転換), transduction (形質導入), conjugation (接合) の3つがある。

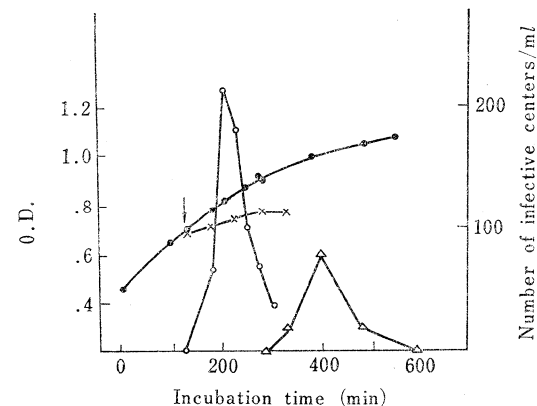
この形質転換とよく似た現象に transfection (トランスフェクション) と呼ばれるものがある。これは菌の DNA の代りにファージから取り出した DNA を、特定の細菌細胞がとり込むことによって起る。図1に示したように、この場合はとり込んだ DNA が細胞内で増殖してファージを作るため、最終的には宿主菌は溶菌を起す。この現象は一種の感染であって、正確には遺伝子伝達 (transmission) ではない。しかし遺伝子移行 (transfer) とみなすことができ、また transformation の可能な菌ではすべてトランスフェクションが見出されている。そしてミコバクテリアではまずこのトランスフェクションの現象が見つかった。

1962年、演者はカリフォルニア大学で、ファージから抽出した DNA が *M. smegmatis* (スメグマ) に感染し、子孫ファージを産生しうることを見出した⁵⁾⁷⁾。このような現象は同年 Romig によって枯草菌でも報告され⁸⁾、その後相ついで幾つかの菌でも見出されたので、transformation と区別するために transfection と呼称されることとなった⁹⁾。

ミコバクテリアのトランスフェクションが、抽出された裸の DNA によって起ることを示す次のような証拠がある^{5)6)10)~17)}。(1) DNA 分解酵素が存在するところの現象は起らない。(2) RNA や蛋白の分解酵素の存在によっては妨げられない。(3) ファージ吸着を阻止する tween 80 はそれを妨げない。(4) ファージ耐性菌に対しても感染が起り、ファージ産出が見られる。(5) 被感染菌のほうにも、感染を受けやすい特定の状態 (competent state) がある。

この competent な状態は、図2に示すように、ブイオン中では菌の対数増殖後期に高くなるが¹¹⁾¹⁵⁾、また人工的にも作りうる事がわかった。すなわち対数増殖中のスメグマ菌液にグリシンを添加すると、菌は増殖をとめるが、その時期にファージ DNA を添加するとトランスフェクションが認められる (図3)^{12)~14)}。

Fig. 3. Transfection of Glycine-sensitized Mycobacterium (ATCC 607) with DNA Extracted from B1 Phage



- O. D. of ATCC 607
- ×—× O. D. of ATCC 607 after addition of glycine
- ▲—▲ Number of infective centers in 607
- Number of infective centers in glycine-treated 607

このような現象は、グリシンの代りに *d*-セリン、*d*-リシン、*d*-スレオニン、*d*-アラニン、あるいはサイクロセリンを用いても見られ¹⁵⁾、私どもはこれをアミノ酸感作³⁵⁾による人工的コンピテンス¹⁶⁾と呼んだ。このような状態は酸性培地中でも得られた¹⁸⁾。

その後ミコバクテリアのトランスフェクションは各国で種々研究されたが、特に Rieber らは1本鎖DNAはとり込まれないことなどを報告した³²⁾。

IV. ミコバクテリアの形質転換の試み

前述のようにトランスフェクションが認められた菌ではすべて形質転換が認められたから、ミコバクテリアでもその可能性に期待が抱かれた。しかし各国で行われたすべての試みは失敗に終わった。

一般に形質転換に成功するためには、少なくとも次の4条件のすべてが揃わねばならぬと考えられる。

- 1) 菌体からDNA分子を傷つけぬよう温和に抽出すること。
- 2) このDNAをとり込むコンピテントな細胞が得られること。
- 3) DNAをとり込んだ細胞が、それを自己の染色体に組込む機構もっていること。
- 4) 組込みを完了した細胞が、引き続き分裂増殖をすること。

このうち(1)に関しては、ミコバクテリア細胞が脂質の多い強固な細胞壁に囲まれているために、DNAを温

Fig. 4. Outline of Gentle Method for Isolation of DNA from Mycobacteria

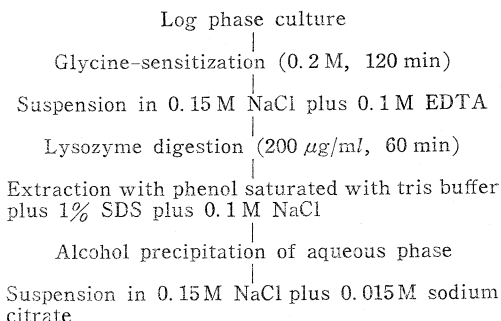
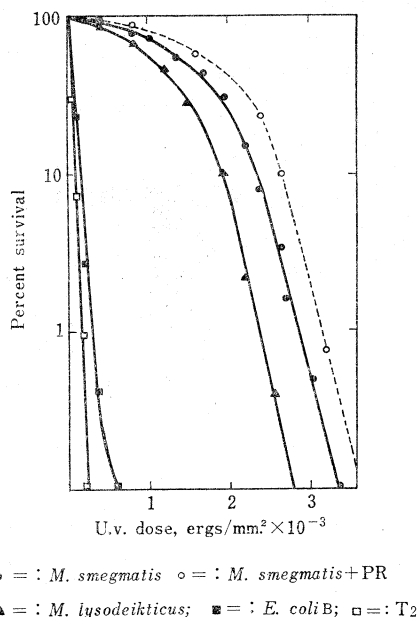


Fig. 5. UV Inactivation and Photoreactivation (PR) of *M. smegmatis* and Reference Survival Curves for *Micrococcus lysodeikticus*, *E. coli* and Coliphage T2



和に抽出することは困難であり、私どもも1968年ころまでは、フレンチプレスや超音波などを用いて菌体を破壊し、DNA抽出を行っていた。ところが前述のように、「アミノ酸感作」した細胞は、リゾチームにより容易に溶菌することが知られた⁵²⁾⁻⁵⁴⁾ので、図4のようなDNA抽出の温和な方法を考案することができた¹⁹⁾。この方法で抽出したスメグマ菌のDNAの分子量は 8.4×10^6 であった¹⁹⁾。

(2)の問題については、種々なコンピテント細胞が得られることを前述したが、(3)の遺伝子組込み機構の存否については、のちに私どもが接合系を発見するまで直接確かめる方法がなかった。しかしこの機構の一部は紫外線傷害の修復機構と関連があることが大腸菌などで知られているので、この面からのアプローチを試みるこ

ととした。図5にスメグマ菌と *Micrococcus lysodeikticus* などの紫外線照射による殺菌カーブを示したが²⁰⁾、この2つの菌は共に強い紫外線抵抗性を示した。紫外線の第一次作用点は、細胞内の DNA の中にチミンダイマーを作ることにあるが、上記の2菌種の DNA はチミン含量が低いことが紫外線抵抗性が強い理由の1つと考えられる。しかしそのほかに、紫外線で損傷した DNA を修復する2つの機構(光活性化酵素と暗回復機構)の両者を、ミコバクテリアはきわめて豊富に有していることが明らかとなった²⁰⁾。この事実は、ミコバクテリアに組換え機構が存在することを示唆するものであるが、このことは、2種類の温度感受性ファージを混合感染させた場合、ファージの組換え体形成が見られるという実験²¹⁾によっても裏づけられた。そしてのちに接合系が発見されるに及び^{22)~25)}、動かしにくい事実となった。

このように概観すると、ミコバクテリアで形質転換が成功しない理由は、(4)の段階に問題があるということになる。この点が目下検討されつつあるが、将来はミコバクテリアでも形質転換が行われる可能性が十分にあると考えられる。

V. ミコバクテリアの形質導入

ある特定のファージは、細菌細胞内で増殖する際その頭部に宿主染色体の一部をとり込み、それを別の細胞に運び込むことによって、宿主遺伝子の伝達を可能にすることが、大腸菌などで知られている(図1参照)。実際に形質導入を行うファージ(transducing phage)は数少なく、通常は溶原化(lysogenization)を行いうるファージの中から見出される。ミコバクテリアの溶原菌を自然界から分離した報告は、Bowmann²⁸⁾、道家²⁹⁾、瀬川³⁰⁾、Imaeda ら³¹⁾のものがある。私どもも多くの人為的溶原菌を作り、紫外線やマイトマイシンによる誘発を行うなど種々検討を行った^{33)~38)}。

このような溶原性ファージを用いて形質導入の試みも数多く行われたが、再現性のある証拠はなかなか得られ

Table 2. Transduction of *M. smegmatis* SN 2 Auxotrophs by Phage 13 Propagated on Wild Strain SN 2

Marker	Colony formers/ml	
	Phage added	No phage added
Glycine *	240	0
Histidine	470	0
Arginine	140	0
Alanine	120	0
Adenine	240	0
Cysteine **	53	4
Leucine	64	0

* Reference 39. ** Unpublished data by Y. Mizuguchi.

なかった。1970年 Ramakrishnan らは、13ファージによりスメグマの SN 2 株に形質導入することに成功した³⁹⁾。私どももこのファージを用い、種々の菌株への導入を試みたが、成功したのは SN 2 株だけであった。表2に Ramakrishnan の成績と私どもの成績とを示した。13ファージは、大腸菌のλファージのように特定の遺伝子だけを導入するのではなく、種々なマーカーを導入するいわゆる普遍形質導入ファージであることは明らかである。

この13ファージが今日知られる唯一の形質導入ファージであるが、将来さらに、種々のファージが見出される可能性がある。ただしファージは自己の遺伝物質より大きな DNA を運搬することはできないので、導入する遺伝子は菌染色体のごく一部にすぎないという制限がある。その意味で、細菌の染色体全般にわたる遺伝解析には不向きであり、その目的には接合系がもっとも便利とされる。

VI. ミコバクテリア接合系の発見

1970年に私どもは、スメグマのある菌株の中で接合が起こることを発見した^{22)~25)}。

Fig. 6. Colony Morphology of Jucho ((a) left), Lacticola ((b) right) and of a Mixture of Jucho and Lacticola ((b))

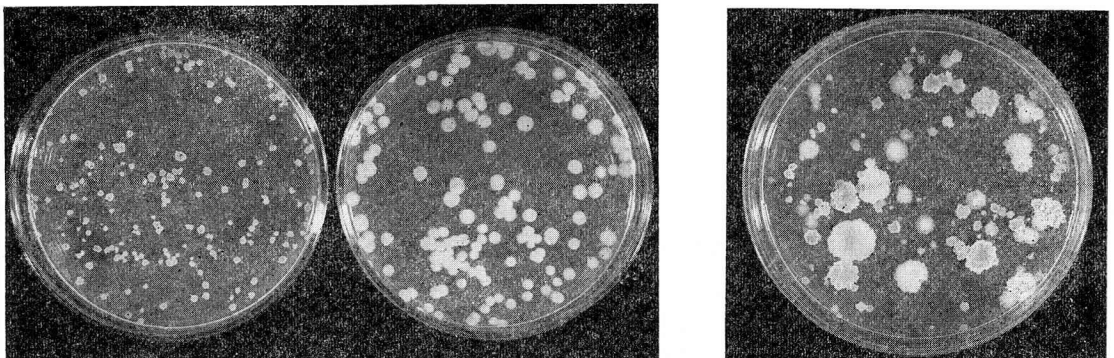


Table 3. Composition of Karlsson's Minimal Medium (J. Bacteriol., 68:592, 1954)

Glycerol	2%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1%
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.002%
MgSO ₄	0.01%
CaCl ₂	0.001%
KH ₂ PO ₄	0.15%
K ₂ HPO ₄	0.4%
Agar	1.5%

図6の写真は、獣調株 (Jucho) とラクチコラ株 (Lac) の菌をそれぞれ単独に普通寒天板上に播いた場合と、両者を混合培養していったん寒天培地上で培養したのち、さらに寒天平板上にひらいた場合とに得られる集落を比較したものである。混合培養した場合には集落の形態がきわめて多様であって、両菌株間になんらかの相互作用が起っていることが示唆される。

スメグマ菌は一般に表3に示す平板培地 (最少培地) に発育可能であるが、ニトロソグアニジンや紫外線で処理して最少培地に発育できない栄養要求変異株をとることができる。たとえば最少培地にグリシンを加えないと発育できない獣調株変異菌を Jucho (*gly*) と書き、アルギニンを加えぬと発育できぬラクチコラ株変異菌を Lac (*arg*) と書くが、この両者をいったん通常の寒天培地 (完全培地) 上で2日間混合培養したのち水浮遊菌液とし、最少培地上に播くと、それぞれの菌単独では全く集落を作りえないが、この場合は10⁸コ播けば数コ割合で集落を生じる。これらの集落は最少培地に継代しても安定である。

このような現象が遺伝的組換え (recombination) によって生じていることを確認するためには、複数のマーカーのついた変異菌の間でかけ合せを行い、特定マーカーで選択して集落を得たのち、その集落のおのおので選択に用いなかったマーカー (unselected marker) がどのように分離 (segregate) しているかをしらべなくてはならない。表4に Rab (*arg, met*) (Rab はラビノイチ株) と Jucho (*gly, leu*) とを最少培地に適当なアミノ酸を2種類ずつ添加した選択培地上でかけ合せた場合の成績を示した。その表の一部を説明すると、アルギニ

Table 5. Results of Crosses R-15 (*arg, met*) × J-5 (*gly, leu*)

Recombinant genotypes	No. of recombinants with selected markers			
	<i>met</i> + <i>leu</i> +	<i>met</i> + <i>gly</i> +	<i>arg</i> + <i>Teu</i> +	<i>arg</i> + <i>gly</i> +
+ + + +	14	25	12	14
<i>arg</i> + + +	1	1		
+ <i>met</i> + +			1	4
+ + <i>gly</i> +	113		120	
+ + + <i>leu</i>		101		103
<i>arg</i> + <i>gly</i> +	5			
<i>arg</i> + + <i>leu</i>		6		
+ <i>met</i> <i>gly</i> +			0	
+ <i>met</i> + <i>leu</i>				0
Totals	133	133	133	121

ンとグリシンを添加した最少培地に1.3×10⁷の混合菌液を播いた場合、それぞれの菌が単独では1コ集落も得られないのに対し、460コ集落が得られたことを示している。この460集落は、メチオニンとロイシンの添加がなくとも発育しえた菌であるが、アルギニンとグリシンについてはどうであるかをしらべたのが表5である。この例では133コ集落についてしらべた結果、113コはグリシン要求性、5コはグリシンとアルギニン要求性、1コはアルギニン要求性、そして14コは野生型であった。このように、非選択マーカーが種々な型に分離することが、とりも直さず、これらの集落が遺伝子の組換えにより生じたものであることを示す決定的な証拠である²⁷⁾。

このようなミコバクテリアの遺伝的組換え現象が今日まで見出されなかった理由を考えてみるのに、この現象が液体培地中では認められず、平板上での混合培養が必要であることがその1つであろう。また同一菌株の間では起らず、同じスメグマという種の中ではあるが、異なった株間でしか認められないこと (interstrain mating) も、大きな理由の1つと思われる。

ところで、この組換え現象が、一方の菌のDNAによる形質変換や、あるいはファージによる形質導入によ

Table 4. Results of Crosses R-15 (*arg, met*) × J-5 (*gly, leu*)

Cross	No. of colonies counted on complete medium	No. of recombinants on selective media supplemented with					Frequency of revertants for individual markers in the parental strains			
		None	Arg Gly	Arg Leu	Met. Gly	Met. Leu	<i>arg-6</i>	<i>met-5</i>	<i>gly-2</i>	<i>leu-7</i>
R-15×J-5	1.3×10 ⁷	140	460	315	490	240	2×10 ⁻⁸	< 1×10 ⁻⁸	< 3×10 ⁻⁸	< 3×10 ⁻⁸

て起るものではなく、異株細胞間の直接の接触、すなわち接合によるものであることは、次のような事実から知ることができる²⁵⁾²⁷⁾。

- 1) 一方の菌の DNA を抽出して、他方の菌と平板上で混合培養しても組換え体を作らない。
- 2) かけ合せ培地中に DNA 分解酵素を添加していても集落形成に影響がない。
- 3) 形質転換や形質導入なら同一株間の系のほうが高頻度に組換え体を作るが、この系では同一株間のかけ合せは成立しない。
- 4) 一方の菌の培養濾液と他方の菌を混合培養しても組換え体形成はみられない。
- 5) 培養濾液中には活性ファージは見出されない。
- 6) 形質転換や形質導入は通常液体培地中で成立するが、この系では成立しない。

VII. 接合における雄性と雌性

細胞間の接合によって遺伝的組換え体ができることはほぼ確実と考えられたが、その場合、ミコバクテリアでも大腸菌のように雄性と雌性の細胞があって、遺伝物質は雌性から雌性へ一方向的に伝達されるのであろうか、あるいは動物の細胞などで知られているように、2種の細胞が融合すること (cell fusion) によって両方の親細胞の性質をもつ組換え体を作られるのであろうか。

私どもの実験によると、ミコバクテリアの場合は前者、すなわち性的接合によるものと考えられる。その理由としては次の3つがある。

1) かけ合せの結果生じる組換え体をしらべると、一方の親の性質を圧倒的に多くもっている²⁷⁾。たとえば表5に示したように、獣調株と Rab 株間に生じた組換え体では、非選択マーカーの大部分が獣調由来のものであって、Rab 由来のマーカーはごく一部にしかみられない。これは Rab が雄性、獣調が雌性であって、遺伝物質は Rab から獣調へと1方向的に移入したことを示唆している。この傾向は、その他の系、たとえば Rab と PM 5 株との間でも認められた²⁷⁾。

2) かけ合せの一方をストレプトマイシン (SM) 耐性にしておき、SM 加平板上でかけ合せを行う場合、もしも組換え体形成が性的接合によるものと仮定すると、雄細胞は単にその遺伝物質を雌細胞に移入する役割を果たせば、あとは生残する必要はないわけであるから、雌細胞のほうさえ SM 耐性であれば、組換え体は正常に形成されるはずである。しかし雌細胞が SM 耐性でない場合には、たとえ雄から SM 耐性遺伝子を受け取ったとしても、その形質はすぐには発現できないから、組換え体形成はみられないと考えられる。一方もし組換え体が細胞融合によって形成されると仮定すれば、この場合両細胞の機能は equivalent であるから、親細胞のどちらが

Table 6. Effect of SM on Frequencies of Prototrophic Colony Formation in Crosses between Rab and Jucho

Cross *	Frequency of prototroph formation on	
	MM	MM plus SM
R-4 <i>arg</i> × J-3 <i>gly</i>	5.9×10^{-6}	$< 1.0 \times 10^{-8}$
R-41 <i>arg, str</i> × J-3	1.3×10^{-6}	$< 1.0 \times 10^{-8}$
R-4 × J-4 <i>gly, str</i>	1.9×10^{-6}	1.6×10^{-6}
R-41 × J-4	1.4×10^{-6}	1.3×10^{-6}

*: Frequency of revertants for individual markers in parental strains *arg*, $< 1.3 \times 10^{-8}$ *gly*, 5.6×10^{-8}

SM 感受性であろうと、等しい結果が得られるはずである。実際に Rab (*arg*) と Jucho (*gly*) のかけ合せの系で、一方を SM 耐性とした場合生じた組換え体形成の頻度を表6に示した。双方ともに SM 感受性菌の場合は組換え体は認められず、また両方が耐性の場合の組換え体形成頻度は 1.3×10^{-6} であったが、これらに対し、Rab だけが SM 耐性の場合には組換え体は形成されず、Jucho だけが耐性の場合の形成頻度は 1.6×10^{-6} であった。この結果は、組換え体形成が性的接合によると仮定した場合に予想した成績と完全に一致するものであり、Rab が雄性、Jucho が雌性であることを示すものである²⁷⁾。

3) かけ合せに用いる菌の中から紫外線感受性の高い変異菌を採る方法があり、さらにそれらの中から組換え体形能を失った菌 (*rec*⁻ 変異菌) をとることができる。かけ合せの一方にこのような *rec*⁻ 菌を用いる場合、組換え体形成が性的接合によるものと仮定すると、雌細胞が *rec*⁻ であれば組換え体は形成されないが、雄が *rec*⁻ であっても影響はないはずである。しかしもしそれが細胞融合によるものと仮定すると、どちらが *rec*⁻ であっても一方が *rec*⁺ であれば等しい結果が得られるはずである。ところが実際に、たとえば Rab (*arg, met*) と PM 5 (*leu, his*) の一方を *rec*⁻ として、*arg*⁺*his*⁺ の組換え体形成能をしらべたところ、Rab が *rec*⁻ の場合には4,000 コの集落形成が認められたのに、PM 5 が *rec*⁻ の場合には1 コの集落形成も認められなかった。すなわち Rab は雄、PM 5 は雌ということになる⁴⁰⁾。

以上の事実から、ミコバクテリアで認められた遺伝的組換え現象は、細胞融合によるものではなく、性的接合によるものであり、遺伝物質は雄細胞から雌細胞へ one way に伝達されることが明らかとなった。

VIII. ミコバクテリアの性因子

大腸菌や緑膿菌には雄性を決定する F 因子や FP 因子があり、これらは接合により高頻度に雌細胞へ移行し、その結果雌細胞を雄細胞へと性転換することが知られている。しかしミコバクテリアの雄には、このように高頻

Table 7. Segregation of Mating Ability in Recombinants from Crosses of Lac (*arg, thi*) by Jucho (*gly, leu*)

Mating ability with		Number of recombinants observed
Lac	Jucho	
+	-	67
-	+	3
+	+	3
-	-	1
		74

変に移行する雄性因子は見出されない²⁴⁾²⁵⁾²⁷⁾。

一方、大腸菌の雌には特別な雌決定因子を見出せないのに、ミコバクテリアの雌細胞には雌性を決定する積極的な性因子がある²⁶⁾²⁷⁾。そして雌因子が雌細胞に入った場合、それらはそれぞれ独立して機能を発揮するので、その細胞はあたかも雌雄同体のように振舞うことになる²⁶⁾²⁷⁾。Lac (*arg, thi*) と Jucho (*gly, leu*) の間の組換え体 74 コについて、親株とのかけ合せ能をしらべた成績を表 7 に示した。そのうち 67 コは Lac とだけかけ合せ可能 (すなわち雌性)、3 株は Jucho とだけ可能 (すなわち雄性)、3 株は両方と可能 (雌雄同体)、そして残り 1 株はどちらともかけ合せが不能であった。

大腸菌の F 因子などは、高温培養や、アクリフラビン、SDS 処理などにより高率に消去できるが、ミコバクテリアの場合、このような消去は、雌雄いずれの因子でも認められなかった²⁵⁾²⁷⁾。

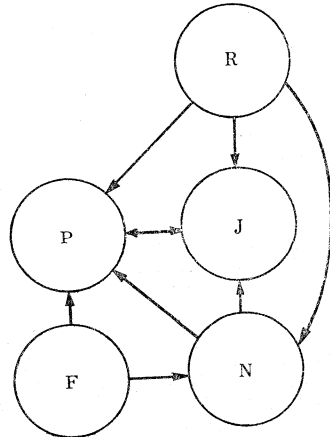
IX. 多極的な性

このようにミコバクテリアの性は、大腸菌などとは大変異なった特徴をもっているが、スメグマに属する多数の菌株についての性関係をしらべているうちに、私どもはさらに不思議な現象に当面した。

前述のように、Rab, Lac, Jucho, PM 5 の 4 株間のかけ合せでは、前 2 者は雄であり、後 2 者は雌であるようにみえたが、Jucho と PM 5 の間のかけ合せでは、組換え体の形成がみられたのである。しかもその場合遺伝物質は、Jucho から PM 5 への方向と、逆に PM 5 から Jucho の方向との 2 方向に移行することが知られた⁴⁰⁾。

さらに株数を増してしらべた結果、図 7 に示すように、18 株のスメグマ菌は性的に 5 群に分かれて、もはや単一の雌雄という関係では律しきれぬことがわかった。たとえば、Rab はどの菌に対しても雄であり、PM 5 は Jucho に対する場合を除くと常に雌であるが、西 1 は、Jucho や PM 5 には雄、Rab や F 21 に対しては雌となるのである⁴⁰⁾⁴¹⁾。Rab に対する雌としての能力を消去した Jucho の変異菌をとることができるが、こ

Fig. 7. Multiple Interstrain Matings in *M. smegmatis*



Note. R : Strain Rabinowitchi and 4 other strains.
 J : Strain Jucho and 7 other strains.
 N : Strain Nishi-1.
 P : Strain PM 5 and 1 strain.
 F : Strain ATCC 607.

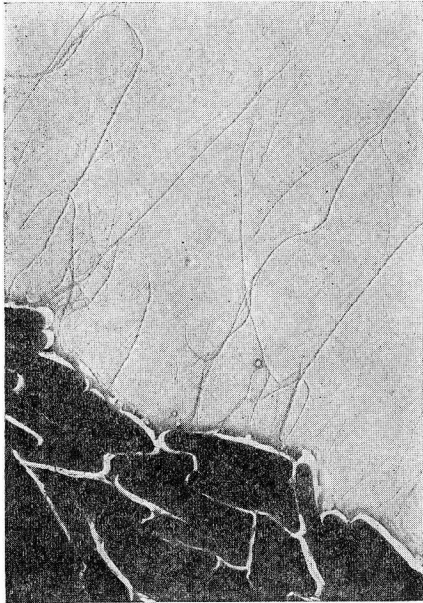
の菌は西 1 に対する雌の能力を必ずしも失っていないので、Jucho は、Rab に対する雌因子とは異なる、西 1 に対する雌因子を別に持っていることになる⁴⁰⁾⁴¹⁾。

このような多極的性関係 (multiple sexuality) は、これまでどの細菌でも知られていないし、また生物界全体を考へてもきわめて珍しい現象で、ある種のカビの中に多少類似の現象を見出しうるにすぎない。

しかし、遺伝物質を供与する側と受容する側との多角的な関係、という観点からこれと類似の現象を探すならば、それはファージとそのレセプターの関係に似ていなくもない⁴¹⁾。1968 年に私どもはミコバクテリアのファージが脂質をもつ可能性を指摘したが⁴²⁾、その後ファージが特異的に吸着するミコバクテリア表面のレセプターも脂質であることを見出した^{43)~47)}。特に D 4 ファージのレセプターは、ミソンド C と呼ばれるペプチドグリコリピドであり、そのレセプター活性部分の構造をも明らかにした⁴⁷⁾。いまスメグマの F 21 株を例にとると、この菌の表面には、D 4 のほかに、これとは血清学的性状などを異にする B 1, A 6, C 3, Y 7, Y 10, Y 13, L 1, L 4, PR, PL, D 29, D 32, GS 4, HC, HP などの多数のファージが吸着しうるから、ミソンド C のほかに、少なくともこれらのファージに対応する数の多種類のレセプター構造が存在するはずである。そしてこのようにも多種類の物質のモザイク構造の間に、またいくつかの種類の雄性や雌性を決める構造物が存在していると想像することは、それほど不自然ではないように思われる⁴¹⁾。

このような多極的性関係は、将来もう少し整理されて、より単純化される可能性もあるが、一方さらに多極化する可能性もあろう。いずれにせよ、性を決定する細胞表

Fig. 8. Pili-like Structure of *M. smegmatis* Strain Rabinowitchi



面構造が、形態学的に、あるいは物質として、捉えられることが必要である。

X. ミコバクテリアの線毛様構造

細胞表面の性的構造物としては、大腸菌の雄性特異線毛 (F pili あるいは sex pili) が知られており、雌雄はこの線毛の架橋により接合し、雄染色体はこの中を通って雌細胞へ移行するものとされる。

ミコバクテリアの電子顕微鏡による微細構造の研究は古くから活発に行われているが、細胞表層小器管の存在に関する明確な報告は少なく、否定的な見解が常識化している。私どもは、性的接合が固型培地上でしか認められぬことから、固型培地上でしか産出されぬ小器管の存在を仮定し、寒天平板上に張ったコロジオン膜上で洗浄菌を培養することにより、その探索を試みた。

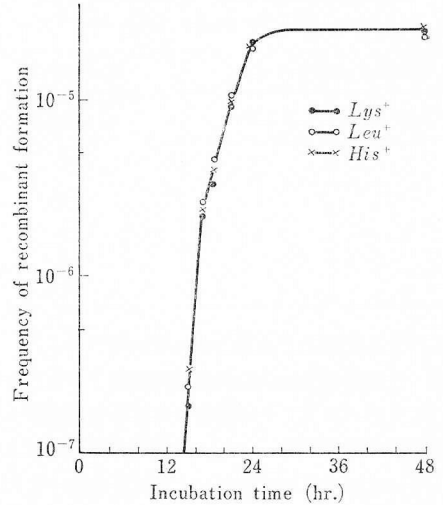
その結果、平板上で増殖中の Rab 株で、図8に示すような線毛様構造を見出した。この構造物はきわめて細長く、時に捩れて繩状構造を示し、細胞当たり1~2本のものから、図のように密生してみえるものもある。しかも、Rabのみでなく、F 21, PM 5, 人型結核菌 ($H_{37}Ra$), 牛型菌 (BCG) でも見出された⁴⁹⁾。

この構造物の化学性状や機能に関する検討は今後の課題である。また性的接合との関連も明らかでなく (最少培地上では形成が認められず、 $42^{\circ}C$ では形成される⁴⁹⁾), その点の検討も続行中である。

XI. 発育のおそいミコバクテリアのかけ合せ

これまで述べてきた接合は、スメグマ種の中で広く認

Fig. 9. Kinetics of Gene-transfer from Rab to PM 5 (*lys*, *leu*, *his*)



められるが、発育のおそいミコバクテリアではまだ見出されていない。

$H_{37}Ra$, BCG, トリ型菌 Kirchberg, 非定型抗酸菌 SP 5, SP 19, NP 25, NP 41, NP 55 の8株から、それぞれ SM, PAS あるいは INH に耐性の菌をとり、その中の薬剤耐性の異なる2種の菌 (たとえば $H_{37}Ra$ の SM 耐性菌と BCG の INH 耐性菌) を普通小川培地上で混合培養し、発育した菌塊をかきとって菌液とし、2剤 (上の例では SM と INH) を含有する小川培地上に塗布して菌の増殖の有無を観察した²⁴⁾。しかし接合が生じたと思われる集落形成の異常増加は認められなかった。

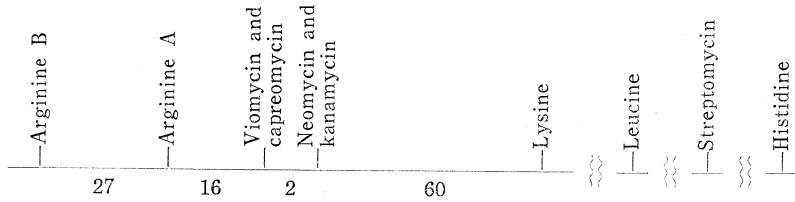
ただし、結核菌などでも線毛様構造が認められているので、この構造が接合の compatibility に関連があるとすれば、これらの菌でも接合系が見出される可能性もあろう。さらに適切な条件の設定が必要と考えられる。

XII. 接合に及ぼす環境条件の影響

接合培地中に0.1%の tween 80が存在すると、接合が妨げられる⁴⁰⁾。tween 80は、ミコバクテリオファージの吸着を妨げることが知られているので、この現象の機作は、雄と雌の接合の最初のステップである接触の阻害にあると思われる。

またミコバクテリアの接合に特徴的なことは、その接合は $42^{\circ}C$ の培養で阻止される⁴⁰⁾。ただし、それぞれの親株を $42^{\circ}C$ で前培養しても影響はない。種々の理由から、雄細胞から雌細胞への移行に際して、DNAが $42^{\circ}C$ では急速に流産するためと考えられる。

また最少培地中に窒素源を欠くと接合が起らない⁴⁰⁾。接合過程には新しい蛋白合成が必要なためであろう。一方グリセリンの存在は、組換え頻度をむしろ低下させた。この理由は不明である。

Fig. 10. Genetic Map of *M. smegmatis* Strain PM 5

XIII. 遺伝子移行のカイネティクス

Rab (野生型) と PM 5 (*lys, leu, his, str-r*) のかけ合せの系で、個々のマーカーが混合培養開始後どのくらいの時間で移行するかをしらべた。一定時間後混合培養菌をかきとり、再接合を妨げるため tween 80 と SM を含む選択培地上に播いて得られた結果を図 9 に示した。テストした 3 マーカーは、混合培養開始約 15 時間後より雌細胞中に見出され、24 時間後にはほぼ移行を完了しているらしいことが知られた。この結果に関する限り、遺伝子移行の性状は、大腸菌の F⁺ に似ているようにみえるが、前述のように高頻度に移行する雄因子は見だされていない。私どもは目下のところ、次項で述べるように、雄因子はむしろ染色体性のもと考えている。

XIV. 薬剤耐性の遺伝解析

接合系を用いて²⁶⁾、あるいは同調培養系を用いての⁵⁰⁾⁵¹⁾ 遺伝子地図作製の試みは、急速に展開するように考えられたが、しかし詳細に検討すると、必ずしも容易でないことがわかった²⁷⁾⁴⁰⁾。なぜなら、雄の染色体遺伝子がかなり広範囲に雌細胞中に入っていると考えられるデータがいくつも得られるにもかかわらず、それらが雌染色体に組込まれる場合、あたかも多数の破片に千切れてあちこちに組み込まれたかのように、相互に一定の関連 (linkage) を示さないのである。

この現象を説明するのにいくつかの可能性が考えられるが、私どもは種々の理由により、1 コの雌細胞が、多数の雄細胞と接合をくり返す (multiple rounds) 可能性は少ないと考えている。むしろそれは、(1) 雄細胞の染色体の移行の起点が一定しないこと、(2) いったん雌細胞に入った雄の染色体のうち、雌の染色体とは異質の部分排除されること (heterologous exclusion) の両方、あるいはいずれかによるものと考えられる。

ところで幸運なことに、Rab と PM 5 の系で私どもは、カナマイシン (KM) とバイオマイシン (VM) の耐性遺伝子が、アルギニン合成遺伝子と密接にリンクしていることを発見した (図 10)。さらにネオマイシン耐性遺伝子は KM 耐性と全く同一箇所に位置し、カプレオマイシン耐性遺伝子は VM 耐性とも全く同一部位にあった。しかし KM 耐性遺伝子と VM 耐性遺伝子とはごく

わずかながら離れており、また SM 耐性遺伝子とこれらの遺伝子との間には一定の連関を見出すことができなかった⁴⁰⁾。

各種薬剤の存在下で、ポリ-U RNA を primer としポリフェルアラニン合成能をチェックした結果、これら遺伝子による SM, KM, VM 耐性の機構は、リボソーム性のものであることが知られた (阪大微研: 増田, 山田両氏による)。大腸菌などでは、このようなリボソーム性遺伝子 (ribosomal gene) は染色体上にクラスター (cluster) を作って密集して存在するが、ミコバクテリアでは SM 遺伝子だけが離れて存在することは興味深い。

XV. おわりに

ミコバクテリアの遺伝学は、性的接合系の発見により近代的な遺伝解析の方法論を獲得し、これまでどの細菌でも知られなかったミコバクテリアに独特な遺伝様式が明らかにされてきた。それは、ある点では大腸菌に似ているが、ある点ではアクチノミセスや、さらに高等なカビ類に類似しており、またある点では類例がみられぬなど、ミコバクテリアが生物界に占める分類学上、ないし系統発生学上の位置とも考え合せて興味深い。

しかし一方、接合系自体の解析にも不明の点が多く、ほとんどはまだ現象論の域を出ていない。その全体像が明らかになるにはなお永い日時を必要とするものと思われる。

また生体内遺伝子伝達系の有無、多剤耐性伝達因子の有無、あるいは毒力の解析など、結核病との関連において重要な問題は、手つかずのまま残されている。これらの解析のためには、人型結核菌での遺伝子伝達系の発現の成否が重要な関門である。

このほか微生物遺伝学の近代的な応用面としては、たとえば自然界に存在しない新しい型のバクテリアを作り、必要な菌体成分を人為的に生合成させるなどの夢が、現実のものとなりつつある。ミコバクテリアの遺伝学においても、いつの日か、こうした応用面にまで発展の可能性が開けるときがくるかもしれない。

謝 辞

本報告を終るに当たり、座長でありかつ細菌学の恩師

である戸田忠雄博士に感謝の意を表します。またこの機会をお与え下さいました恩師武谷健二総会長、ならびに学会役員の先生方に心からお礼申しあげます。

ここに報告した研究の大部分は、国立予防衛生研究所結核部において行われたものでありまして、終始変らぬご理解とご援助を賜りました室橋豊穂部長に厚くお礼申しあげます。

研究に当たっては、多数の方々のご協力、ご支援を得ましたが、特に接合に関しては須賀清子、トランスフェクションに関しては中村玲子、薬剤耐性機構については阪大微研(堀三津夫教授)の増田国次、山田毅の各博士のご協力を得ました。また全般にわたり、丸山米夫技官の技術援助に負うところが大きく、記して謝意を表します。

文 献

- 本講演の性質上、引用文献は私ども自身の原著を主体とした。
- 1) Bulletin International Union against Tuberculosis, XLIII : 235, 1970.
 - 2) Host-virus relationships in Mycobacterium, Nocardia and Actinomyces, ed. by S. E. Juhasz, et al. C. C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, 1970.
 - 3) Tokunaga, T., Mizuguchi, Y. and Murohashi, T.: J. Bacteriol., 86 : 608, 1963.
 - 4) 徳永徹・水口康雄・室橋豊穂: ウイルス, 12 : 221, 1962.
 - 5) Tokunaga, T. and Sellers, M. I.: J. Exptl. Med., 119 : 139, 1964.
 - 6) Sellers, M. I. and Tokunaga, T.: J. Exptl. Med., 123 : 327, 1966.
 - 7) Tokunaga, T. and Sellers, M. I.: Bacteriol. Proc.: 146, 1963.
 - 8) Romig, W. R.: Virology, 16 : 452, 1962.
 - 9) 徳永徹: 蛋白質核酸酵素, 12 : 8, 1967.
 - 10) 徳永徹・中村玲子: 医学と生物学, 71 : 384, 1965.
 - 11) 徳永徹・中村玲子: 医学と生物学, 72 : 51, 1966.
 - 12) 中村玲子・徳永徹: 医学と生物学, 72 : 79, 1966.
 - 13) 中村玲子・徳永徹: 医学と生物学, 72 : 296, 1966.
 - 14) 徳永徹・中村玲子: 医学と生物学, 72 : 321, 1966.
 - 15) Tokunaga, T. and Nakamura, R. M.: J. Virology, 1 : 448, 1967.
 - 16) 徳永徹・水口康雄・中村玲子: 東大応微研シンポジウム第9集: 92, 1968.
 - 17) Tokunaga, T. and Nakamura, R. M.: J. Virology, 2 : 110, 1968.
 - 18) Nakamura, R. M.: In "Host-virus relationships in Mycobacteria, Nocardia and Actinomyces", ed. by S. E. Juhasz, et al., p. 166, C. C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, 1970.
 - 19) Mizuguchi, Y. and Tokunaga, T.: J. Bacteriol., 104 : 1021, 1970.
 - 20) Sellers, M. I., Nakamura, R. M. and Tokunaga, T.: J. gen. Virology, 7 : 233, 1970.
 - 21) Mizuguchi, Y. and Sellers, M. I.: In "Host-virus relationships in Mycobacterium, Nocardia and Actinomyces", ed. by S. E. Juhasz, p. 65, C. C. Thomas-Publisher, Springfield, Illinois, 1970.
 - 22) 水口康雄・徳永徹: 医学と生物学, 80 : 163, 1970.
 - 23) 水口康雄・徳永徹: 医学と生物学, 81 : 201, 1970.
 - 24) 徳永徹・水口康雄: 医学と生物学, 81 : 289, 1970.
 - 25) Mizuguchi, Y. and Tokunaga, T.: Jap. J. Microbiol., 15 : 359, 1971.
 - 26) Mizuguchi, Y.: Jap. J. Microbiol., 16 : 77, 1972.
 - 27) Tokunaga, T., Mizuguchi, Y. and Suga, K.: J. Bacteriol., 113 : 1104, 1973.
 - 28) Bowmann, B. U. and Redmond, W. B.: Amer. Rev. Resp. Dis., 80 : 232, 1959.
 - 29) 道家直: 熊本医学会雑誌, 34 : 1360, 1960.
 - 30) Segawa, J., Takeya, K. and Sasaki, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 81 : 419, 1960.
 - 31) Imaeda, T. and Rieber, M.: In "Host-virus relationships in Mycobacterium, Nocardia and Actinomyces" ed. by S. E. Juhasz, p. 189, C. C. Thomas-Publisher, Springfield, Illinois, 1970.
 - 32) Rieber, M. and Imaeda, T.: Ibid., p. 144, 1970.
 - 33) 徳永徹・水口康雄・室橋豊穂: 日本細菌学雑誌, 18 : 348, 1963.
 - 34) Tokunaga, T., Mizuguchi, Y. and Murohashi, T.: Amer. Rev. Resp. Dis., 90 : 431, 1964.
 - 35) Tokunaga, T. and Sellers, M. I.: In "Host-virus relationships in Mycobacterium, Nocardia and Actinomyces", ed. by S. E. Juhasz, et al., p. 227, C. C. Thomas-Publisher, Springfield, Illinois, 1970.
 - 36) 水口康雄: 日本細菌学雑誌, 19 : 169, 1964.
 - 37) 水口康雄: 日本細菌学雑誌, 19 : 489, 1964.
 - 38) 水口康雄: 日本細菌学雑誌, 20 : 290, 1965.
 - 39) Sundar, Raj, C. V. and Ramakrishnan, T.: Nature, 228 : 280, 1970.
 - 40) 水口康雄・須賀清子・徳永徹: 第29回日本細菌学会関東支部総会予稿集, p. 5, 東京, 1973.
 - 41) 徳永徹: 蛋白質核酸酵素, 17 : 692, 1972.
 - 42) Sellers, M. I. and Tokunaga, T.: In "Host-virus relationships in Mycobacterium, Nocardia and Actinomyces," ed. by S. E. Juhasz et al., p. 134, C. C. Thomas-Publisher, Springfield, Illinois, 1970.
 - 43) 徳永徹・片岡哲郎・須賀清子: 医学と生物学, 77 : 225, 1968.
 - 44) 徳永徹・片岡哲郎・須賀清子・保田友義: 医学と生物学, 78 : 141, 1969.
 - 45) Tokunaga, T., Kataoka, T. and Suga, K.: Amer. Rev. Resp. Dis., 101 : 309, 1970.
 - 46) Tokunaga, T., Sellers, M. I. and Furuchi, A.: In "Host-virus relationships in Mycobacterium, Nocardia and Actinomyces", ed. by S. E. Juhasz, et al., p. 119, C. C. Thomas-Publisher, Springfield, Illinois, 1970.
 - 47) Furuchi, A. and Tokunaga, T.: J. Bacteriol., 111 : 404, 1972.

- 48) Tokunaga, T. and Murohashi, T.: Jap. J. Med. Sci. Biol., 16:13, 1963.
- 49) 徳永徹・水口康雄・須賀清子：第29回日本細菌学会関東支部総会予稿集, p. 56, 1973.
- 50) 水口康雄：医学と生物学, 81:215, 1970.
- 51) 水口康雄：医学と生物学, 81:243, 1970.
- 52) 水口康雄・徳永徹：医学と生物学, 76:301, 1968.
- 53) 水口康雄・徳永徹：医学と生物学, 77:57, 1968.
- 54) 徳永徹・水口康雄：医学と生物学, 77:139, 1968.