



Title	Bacillus属プロトプラスの再生とその応用
Author(s)	赤松, 隆
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/194
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Bacillus 属 プロトプラストの再生とその応用

赤松 隆

1984年

目 次

緒 論

1

第 1 章 Bacillus 属 プロトプラストから桿状 栄養細胞への再生

5

第 1 節 緒 言

5

第 2 節 実験材料と実験方法

6

第 3 節 結 果

1. 再生頻度に及ぼす血液増補剤の効果 17
2. ポリビニルピロリドンとデキストラ
ン濃度の影響およびビニルピロリドン
の再生阻害効果 20
3. 血液増補剤と硬寒天による再生効果 22
4. 血液増補剤添加培地中におけるプロ
トプラストの出芽分裂 23
5. 再生頻度に及ぼすカサミノ酸の影響 24
6. 血液増補剤を含まない再生培地でも
高頻度に再生する突然変異体の分離 27
7. rgn と既知再生突然変異 gtaとの比較 29
8. rgn 遺伝子の遺伝子座位 30
9. rgn 突然変異体の諸性質 32

第 4 節 考 察

37

第 5 節 要 約

40

第2章 プロトプラスト形質転換および挿入不活性ベクターの作製	43
第1節 緒言	43
第2節 実験材料と実験方法	44
第3節 結果	
1. プラスミド形質転換の条件	50
2. 種々の <u>Bacillus</u> 属におけるプロトプラスト形質転換 DNA によるプロトプラスト形質転換	53
3. <u>B. subtilis</u> と <u>E. coli</u> シャトルベクタ - プラスミド	54
4. <u>B. subtilis</u> における挿入不活性ベク ターの作製	63
第4節 考察	69
第5節 要約	71
第3章 プロトプラスト融合	73
第1節 緒言	73
第2節 実験材料と実験方法	74
第3節 結果	
1. プロトプラスト融合の条件	76
2. <u>Bacillus</u> 属細菌における同種間細胞 融合	77
3. 異種間細胞融合によるプラスミドの 移入	81

4. <u>B. subtilis</u> と <u>B. licheniformis</u> との間 の異種間組換え	84
第4節 考 察	86
第5節 要 約	87
第4章 高頻度再生法とその応用	89
第1節 緒 言	89
第2節 実験材料と実験方法	90
第3節 結 果	
1. フロトフラストの高頻度再生	93
2. 高頻度 フロトフラスト再生法による 融合および形質転換	98
3. フロトフラスト融合法による簡便な 遺伝子座位決定法	101
第4節 考 察	106
第5節 要 約	107
総 括	109
参考文献	115

緒論

植物細胞および真菌類のプロトプラストはポリエチレングリコールまたはリン酸カルシウム処理により融合することが知られている。⁽¹⁾一方、細菌 Bacillus subtilis および B. megaterium のプロトプラスト融合は 1976 年それぞれ Schaeffer と Hotchkiss⁽²⁾ および Fodor と Alföldi⁽³⁾ によって上記処理により報告された。それ以来、数多くの細菌でプロトプラストによる融合実験がおこなわれた。⁽⁴⁻⁸⁾ 1979 年には Chang と Cohen⁽⁹⁾ により B. subtilis のプラスミド DNA によるプロトプラスト形質転換も開発され、プロトプラストを利用する研究が今後ますます増え続けることが予想できる。プロトプラスト融合により、遺伝交換系の構築、簡便な育種、さらに DNA クローニング操作におけるプロトプラストの高頻度形質転換など数多くの可能性を秘めている。しかしながら、プロトプラストを用いた形質転換に関する知見は少ない。すなわち、染色体 DNA による形質転換体出現頻度はプラスミド DNA による頻度に比べると極端に低いこと⁽⁹⁾、プラスミドモノマーでも取り込まれる等、従来のよく知られたコンピテント細胞による形質転換とは異なる特徴を持つ。また、形質転換、接合、形質導入、トランスフェクションなど一方向性の DNA の移入と異なり、プロトプラスト融合では細胞質の混合が生ずる。その際、菌体成分の混合のされ方、

DNA合成の様式、DNAの分配、分裂の仕方など生化学的な面の研究はほとんど皆無といってよい。本研究はプロトプラストの生理面の幾らかを明らかにし、プロトプラストの利用、応用面について論じたものである。

第1章においてはリプロトプラストの再生に必要な血液増補作用を有するゼラチン、馬血清あるいは牛血清アルブミンなどの再生に及ぼす役割、2)上記複雑な物質を含まない単純な培地の検索、3)液体培地中でのプロトプラストの分裂、ならびに4)再生様式について述べた。さらに、今まで研究されたことのない高頻度再生突然変異体(rgn 突然変異体)を分離し、その遺伝子の染色体上の位置、rgn 突然変異の諸性質ならびに再生との関係について述べる。

第2章では Bacillus 属への Staphylococcus aureus 由来のクロラムフェニコール耐性プラスミド pTP4 DNA によるプロトプラスト形質転換、Escherichia coli と B. subtilis 間のシャトルベクタープラスミド (pJJK310 と pJJK523) による形質転換およびその際に生じる B. subtilis に特異的なプラスミド DNA の欠失について研究した。さらに DNA クローニングにとって有用な挿入不活性符号 (insertional inactivation marker) の作製について述べた。

第3章では、Bacillus 属において同種間細胞融合 (B. subtilis、B. megaterium および B. licheniformis) および異種間細胞融合 (B. subtilis と B. amyloliquefaciens、

B. licheniformis、B. megaterium、B. pumilus）を行い、B. megaterium におけるアミノ酸要求遺伝子（ilv-1、ilv-2、arg-1、thr-1、gly-1 および trp-1）の連関関係について調べた。

第4章では、B. subtilis プロトプラストを 100 % の高頻度で再生する方法について検討し、応用面の一例として、遺伝子の簡便な染色体上の座位決定法について述べた。

なお、最後に本研究の結果を総括し、Bacillus 属プロトプラストを利用する手法について将来の展望を述べた。

第1章 Bacillus 属 プロトプラストから 桿状栄養細胞への再生

第1節 緒言

1953年 Weibull によって「グラム陽性細菌のリゾームで誘導したプロトプラストは、これらの形で分裂、再生することができない」と報告され⁽¹²⁾、プロトプラストから桿状栄養細胞へ復帰させる条件が研究されてきた。

1963年 Landman と Halle は Bacillus subtilis のリゾーム処理で得た球状の細胞の超薄切片を電子顕微鏡観察で調べ、細胞壁を完全に欠く細胞に対しプロトプラストと名づけ、そのプロトプラストから桿状細胞への復帰(再生)を促進する培地として高濃度(30%)ゼラチンおよび硬寒天(2.5% 寒天)培地を報告した⁽¹³⁾。さらに軟寒天(0.8% 寒天)および馬血清は、プロトプラストから桿状細胞への復帰の途中で得られる不規則な形で分裂しつづけるL型細胞の増殖に必要であると述べている。⁽¹³⁾その後も主として、Landmanらの精力的な研究により、B. subtilis プロトプラストのL型増殖に低濃度(2%)のゼラチンと牛血清アルブミンが必要であること、桿状細胞への再生にメンブランフィルター、細胞壁画分またはオートクレーブした B. subtilis 細胞の添加が必要であることが見い出された。⁽¹⁴⁻¹⁷⁾

再生培地にしばしば用いられるゼラチン、馬血清、あるいは牛血清アルブミンは実際上複雑な組成をもっており、馬血清は核酸をも含むので、プロトプラスト融合体をアミノ酸または核酸を指標として直接選択できず、またL型増殖や再生機構を調べる際の媒体規格、再現性を高める上で困難をともなう。本章では上述の三物質には共通して血液増補作用があることに着目し、上記以外の血液増補剤であるデキストランとポリビニルピロリドンのプロトプラスト再生促進性を、血液増補剤の性質、固体培地および液体培地でのプロトプラストの増殖様式に関して調べた。さらに、血液増補剤を含まない培地上でも高頻度に再生可能な突然変異体を分離し、突然変異遺伝子の遺伝子座位を決め、その性格づけを行ひプロトプラストの再生機構について考察した。

第2節 実験材料と実験方法

菌株およびバクテリオファージ 使用した Bacillus

subtilis の菌株を表1-1に示す。プロトプラストから裸状栄養細胞への再生条件の検討には B. subtilis 168S⁽¹⁸⁾ を用いた。高頻度再生突然変異体分離は親株として B. subtilis YSII⁽¹⁹⁾ を用い、その突然変異体の性格づけのため PBSI ファージ⁽¹⁸⁾ および φ29 ファージ⁽²⁰⁾ を用いた。rgn-1 突然変異株を構築するための親株として B. subtilis CT6-1

表1-1。菌株およびフージリスト

菌株 および フージ	遺伝子型	起源および由来
菌株		
<u>B. subtilis</u>		
168 S	<u>trpC2</u> , <u>strA</u>	* a
LM HA	<u>purA16</u> , <u>leuA8</u> , <u>metB5</u> , <u>hisA3</u>	*
YS II	<u>purB6</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u>	*
AG-5	<u>purB6</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u> , <u>rgn-1</u>	YSII の <u>rgn</u> 突然変異体
AH-6	<u>purB6</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u> , <u>rgn-2</u>	YSII の <u>rgn</u> 突然変異体
AH-8	<u>purB6</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u> , <u>rgn-3</u>	YSII の <u>rgn</u> 突然変異体
AA-7	<u>purB6</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u> , <u>rgn-4</u>	YSII の <u>rgn</u> 突然変異体
PRA1	<u>purB6</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u> , $\phi 29^r$	YSII の $\phi 29^r$ 自然突然変異体
PRA2	<u>purB6</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u> , $\phi 29^r$	YSII の $\phi 29^r$ 自然突然変異体
PRA3	<u>purB6</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u> , $\phi 29^r$	YSII の $\phi 29^r$ 自然突然変異体
PRA4	<u>purB6</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u> , $\phi 29^r$	YSII の $\phi 29^r$ 自然突然変異体
PRA5	<u>purB6</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u> , $\phi 29^r$	YSII の $\phi 29^r$ 自然突然変異体
CT6-1	<u>cysA14</u> , <u>hisH2</u>	QB944 (<u>purA16</u> , <u>cysA14</u> , <u>trpC2</u>) の誘導体
CT10-1	<u>cysA14</u> , <u>strA</u> , <u>hisH2</u>	QB944 よりの誘導体
CT11-2	<u>hisH2</u>	CT6-1 の AG-5 DNA による Cys ⁺ 転換体
CT11-6	<u>hisH2</u> , <u>rgn-1</u>	CT6-1 の AG-5 DNA による Cys ⁺ Rgn ⁻ 転換体
CT11-12	<u>hisH2</u> , <u>rgn-1</u>	CT6-1 の AG-5 DNA による Cys ⁺ Rgn ⁻ 転換体
フージ		
PBS1		*
$\phi 29$		** b

- a. 関 達治 博士より分譲
 b. 斎藤日向 教授より分譲

rgn-1 および rgn-2 突然変異の遺伝子座位を決定するため B. subtilis CT10-1 を用い、次のように構築した。B. subtilis QB944 (purA16、cysA14、trpC2)⁽¹⁸⁾ の B. subtilis 1-18 (hisH2)⁽¹⁸⁾ DNA による Trp^+ His^- 形質転換体を分離した。続いてその形質転換体の B. subtilis 168S DNA による Ade^+ 形質転換体として B. subtilis CT6-1 (cysA14, hisH2)、 Ade^+ Str^r 形質転換体として B. subtilis CT10-1 (cysA14, strA, hisH2) を構築した。

培地 NB 培地は 1l 当り 牛肉エキス 10g、ポリペプトン 10g、NaCl 2g を含み、その寒天培地 (NA 培地) には培地 1l 当り 寒天 15g を加えた。Spizizen 最少培地⁽²¹⁾ は 1l 当り グルコース 5g、クエン酸ナトリウム 1g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g、 KH_2PO_4 6g、 K_2HPO_4 14g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g を含む。必要に応じてアミノ酸および核酸塩基は最終濃度でそれぞれ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えた。プロトプラストから桿状栄養細胞への再生に用いる基礎培地 (HC 培地) は Wyrick と Rogers の DPA 培地⁽²²⁾ を改変したもので、グルコース 5g、カサミノ酸 5g、L-トリプロファン 0.1g、 K_2HPO_4 3.5g、 KH_2PO_4 1.5g、 MgCl_2 1.9g、2M コハク酸ナトリウム (pH7.3) 250 ml に蒸留水を加えて 1l とした。HCH-10 培地は HC 培地 1l 当り 馬血清 (日本バイオテスト社、東京) 100ml をろ過殺菌後、熱処理 (56°C, 30 分) して添加した。HCP-3 および HCD-3 培地は HC

培地 1l 当り、それぞれポリビニルピロリドン (K30、和光純薬工業株式会社、大阪) 30g、デキストラン (分子量 500,000、和光純薬工業株式会社、大阪) 30g を加え、HCV-3 培地にはビニルピロリドン (和光純薬工業株式会社、大阪) 30g を加えた。HMP-3 培地はカサミノ酸 5g と L-トリプトファン 0.1g の代わりに $(NH_4)_2SO_4$ 2g とクエン酸ナトリウム 1g を使用した以外は HCP-3 培地と同じである。*B. subtilis* プロトプラストから正常な桿状生育細胞への再生実験に用いた HC、HCH、HCP、HCD、HCV および HMP 寒天培地には特に記載がない限り、培地 1l 当り 寒天 8g を加えた。PBSI ファージ粒子数測定に用いた Y 培地⁽²³⁾ は 1l 当り NaCl 4g、K₂SO₄ 5g、KH₂PO₄ 1.5g、Na₂HPO₄ 3g、酵母エキス 1g、MgSO₄ 0.12g、CaCl₂ 0.01g、FeCl₃ 0.01g を含む。

プロトプラストの調製と再生 30°C 14 時間 NA
培地上で増殖させた *B. subtilis* 168S (trpC2, strA) を
20 ml の NB 培地に 1 白金線植菌し、30°C で振盪培養した。6-8 時間後、培養液濁度 (A_{570 nm}) が 0.4 になれば 25 ml の NB 培地に初発細胞濁度 A_{570 nm} = 0.025 となるように植菌し、37°C で 2 時間培養する。対数増殖期の栄養細胞培養液 20 ml を遠心分離 (7,200 × g、10 分) し、集めた細胞に 4 ml の 250 µg/ml 濃度リソチームを含む Wyrick & Rogers の SMM [0.5 M サッカロース - 0.02 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.5) - 0.02 M MgCl₂]⁽²²⁾ を加える。

全量を滅菌 100 ml 容三角フラスコに移し、恒温振盪培養機で 42°C 45 分間、70 回/分で振盪した。その懸濁液を滅菌水で 10 倍希釈し、NA 培地上に塗沫、37°C 1 日培養すると、約 1×10^{-8} の頻度（プロトプラスト化以前の生菌数当りのプロトプラスト化後の浸透圧ショック耐性コロニー数）でコロニーが出現した。1 個の桿状細胞は平均 1.5-2.0 個のプロトプラストに相当する。リゾチームを含んだ SMM 中で保温後、3 ml の懸濁液を 10 ml の SMM を含む遠心分離管に移し、遠心分離（4,000 × g、10 分間）する。菌塊を HC 培地で懸濁後、適当に希釈し、浸透圧を調整した培地に塗沫し、30°C 2-5 日間培養する。再生頻度は、プロトプラスト化以前の生菌数当りの再生体（再生培地上のコロニー）の割合である。顕微鏡観察より、4 日培養後の HC、HCH-10、HCD-3 および HCP-3 寒天培地上の個々のコロニーは桿状細胞または桿状細胞と L 型細胞の混合から成っている。

液体培地中のプロトプラスト培養 プロトプラストを浸透圧を調整した HC、HCP-3、HCD-3 および HCH-10 培地中に懸濁、30°C で保温し、経時的に液体培地から試料を採取した。細胞濃度は A_{570 nm} で、プロトプラスト数はトーマ血球計で調べた。再生中のプロトプラストの形態的変化は位相差顕微鏡（オリンパス BH-2）によって調べた。写真撮影は富士写真フィルムネオペン SS (ASA 100) とニコンカメラ付属品でおこなった。

$N-\times \text{チル}-N'$ = $\text{トロ}-N$ = トロソグアニジン (NTG)
突然変異処理 Adelberg の方法⁽²⁴⁾ に基づき NTG 処理した。5 ml の NB 培地で 37°C 14 時間振盪培養した B.

Bacillus YSII (purB6, leuB8, arg-15) の培養液を 20 ml の NB 培地に 0.2 ml 植菌し、37°C で 2 時間振盪培養する。対数増殖期の細胞を遠心分離 (7,200 × g, 10 分) で集め、200 µg/ml 濃度の NTG を含む 0.1 M トリス-0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) 10 ml に懸濁し、全量を滅菌 100 ml 容三角フラスコに移す。37°C 30 分ゆるやかに振盪 (70 回/分) した菌体を遠心分離で集め、同上緩衝液で洗浄後、1 ml の NB 培地に懸濁する。その 0.1 ml を 5 ml の NB 培地に植菌し、37°C 14 時間 振盪培養する。

高頻度再生突然変異体の分離 NTG 突然変異処理した細胞培養液より「プロトプラストの調製と再生」で述べたようにプロトプラストを調製し、HC 培地に塗沫し、30°C 4 日 培養した。出現したコロニー (100-200 個) を集め、NB 培地に植菌培養後、再びプロトプラストを調製し、HC 培地に塗沫し、30°C 4 日 培養する。この操作を繰り返し、HC 培地上で高頻度に再生する突然変異体を分離する。

DNA の抽出 および 形質転換 DNA の抽出は齊藤と三浦の方法⁽²⁵⁾ に従った。すなわち、NB 培地で 37°C 振盪培養した対数増殖期後期の B. subtilis 培養液 1 l から

遠心分離 ($7,200 \times g$ 、10分) で細胞を集め、 2 mg/ml リゾチームを含む 6 ml $0.5\text{ M NaCl} - 0.1\text{ M EDTA}$ (pH8.0) に懸濁する。 37°C 10-20分保温後、凍結、融解し、溶菌後 50 ml 0.1 M トリス塩酸 (pH9.0) - 1% SDS - 0.1 M NaCl を加え、 60°C 数分保ち完全に溶菌させる。続いて 60 ml の飽和エタノール液 [48 ml エタノールと 12 ml 0.1 M トリス塩酸 (pH9.0) - 1% SDS - 0.1 M NaCl 混合液] を加え、約15分間ゆるやかに振盪後、低速遠心分離し ($2,000 \times g$ 、10分)、水層に2容の冷エタノール (-40°C) を加え析出するDNAをガラス棒で巻き取り、 $0.15\text{ M NaCl} - 0.015\text{ M}$ クエン酸ナトリウム ($1 \times \text{SSC}$) に溶解し形質転換用いた。

形質転換法は Anagnostopoulos と Spizizen の方法(26)に従った。 5 ml NB 培地中で 37°C 1晩(14時間)振盪培養した受容菌培養液 0.25 ml を 25 ml NB 培地に植菌し、 37°C で振盪培養する。約2時間後、対数増殖期細胞を遠心分離 ($7,200 \times g$ 、10分) で集め、形質転換培地I ($200\text{ }\mu\text{g/ml}$ カザミン酸と $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ L-トリプトファンを含む Spizizen 最少培地、必要ならばアミノ酸は $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、核酸塩基は $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 最終濃度で含む) に 1×10^8 細胞/ ml 濃度となるように懸濁し、 100 ml 容三角フラスコ中 10 ml にて 37°C 振盪培養する。4時間後、 18 ml の形質転換培地II ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$ カザミン酸と $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ L-トリプトファンを含む Spizizen 最少培地、必要ならばアミノ酸は $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、核酸塩基は $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ で含む)

に 2 ml 培養液を植菌し、37°C で 1.5 時間振盪培養する。このようにして得た 0.9 ml のコンピテント細胞液と 0.1 ml の DNA 溶液とを混ぜ、37°C 30 分間 ゆるやかに振盪し、適当に希釈して選択培地に塗沫する。

分泌粗酵素液の調製 被試験菌を 5 ml の NB 培地に 1 白金線植菌し、37°C 1 晩 (14 時間) 振盪培養した (前培養)。前培養した菌体を NB 培地で洗浄後、元の濃度に NB 培地で懸濁し、NB 培地 (500 ml 容量坂口フラスコ中 100 ml 培地量) に 1 ml 植菌し、37°C で振盪培養した。経時的に培養液を採取し、培養液の 1 部 5 ml を 2,000 × g、10 分遠心分離し、上澄みを粗酵素液 (α -アミラーゼおよびプロテアーゼの粗酵素液) として用いた。残りの培養液を A 570 nm による細胞濁度測定に用いた。

α -アミラーゼ活性測定 α -アミラーゼ活性は Fuwa らによって述べられた方法⁽²⁷⁾ で調べた。 α -アミラーゼ定量の反応液 2 ml はアミロース (和光純薬工業株式会社、大阪) 2 mg、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) 0.5 ml、粗酵素液 0.5 ml を含む。40°C 30 分間反応後、0.5 N 酢酸 5 ml を加え反応を止める。その 0.5 ml に I₂ 溶液 (10% KI を含む 1% I₂ 溶液を 200 倍希釈した溶液) 5 ml を加え、A_{700 nm} で糊精化を測定した。1 単位は 40°C 30 分に A_{700 nm} を 10% 低下させるアミロースの mg 数と定義した。

フロテアーゼ活性の定量
 応液⁽²⁸⁾ 3 ml はカゼイン(メルク社) 15 mg、100 mM リン酸緩衝液(pH 7.5) 2.5 ml、粗酵素液 0.5 ml を含む。30°C 40分反応後、0.5 N 酢酸 2.5 ml を加え反応を止める。30分放置後、東洋ろ紙 No.2 でろ過した後、ろ液 1 ml を 0.25 M Na₂CO₃ 5 ml に加え、40°C 5分保温する。さらに 5 倍希釈した Folin 液(和光純薬工業株式会社、大阪) 1 ml を加え、20分後に A 660 nm の吸収を測定した。上記反応条件下で 1 分間に 1 µg のチロシン相当量を可溶化できる酵素量を 1 単位と定義した。

オートリシン活性の測定 オートリシンおよび細胞壁の調製は Fan の方法⁽²⁹⁻³¹⁾に従った。NB 培地中で 37°C 振盪培養して得た 200 ml 培養液中の対数増殖期の細胞を遠心分離 ($7,200 \times g$ 、10 分) で集め、洗浄後、トリス-カリウム緩衝液 (0.1M トリス-0.1M 塩化カリウム, pH 8.0) 5 ml に懸濁する。懸濁液は -40°C のエタノールで冷却しながら、スペシャルマイクロチップ[®] (ブランツン超音波破碎機、モデル 350) 最高出力で 2 分間、超音波破碎し、 $1,000 \times g$ 、5 分遠心分離を行い、未破碎細胞を除き、その上澄を $27,000 \times g$ 、5 分遠心分離し細胞壁を集め。2-3 度トリス-カリウム緩衝液で洗浄を繰り返して得た画分をオートリシンを含む細胞壁として用いた。

細胞壁分画から 3M LiCl 中で 0°C 10 分間 抽出したオートリシンの活性は、10 分間煮沸処理した細胞壁懸

濁液中に希釈して測定した。トリス-カリウム緩衝液中でオートリシンを含む細胞壁もしくは細胞壁とオートリシンから成る溶液の初発濁度が $A_{540\text{nm}} = 0.2$ となるようにし、 $A_{540\text{nm}}$ の減少の割合を求めた。

運動性および鞭毛染色 運動性は 0.5% 寒天を含む NB 培地上に菌体を植菌し、30°C 1 晩培養して調べた。さらに光学顕微鏡下で観察した。鞭毛染色は Doetsch の方法⁽³²⁾に従った。すなわち、飽和硫酸カリウムアルミニウム 1ml、5% フェノール 2.5ml、20% タンニン酸 1ml から成る溶液 4.5ml に フクシン（和光純薬工業株式会社、大阪）1.1g、99.9% エチルアルコール 10ml から成る溶液 1ml を加え、東洋ろ紙 No.2 でろ過後、染色液とする。カバーガラス上に蒸留水 1滴おき、その上に NA 培地上 30°C 1 晩静置培養した被試験菌をのせる。風乾後、染色液を 1滴のせ、室温で 15 秒後、静かに水洗し風乾する。スライドガラス上にカバーガラスをのせ固定後、鞭毛の有無を光学顕微鏡下で観察した。

Φ29 フージ感受性試験 PBSI および Φ29 フージの感受性はスポット試験によって調べた。

Φ29 フージ耐性突然変異体の分離 Φ29 フージ耐性突然変異体は Young ら⁽³³⁻³⁴⁾により述べられたようにして B. subtilis YSII および 168S より分離した。5ml

の 5 mM MgSO_4 を含む NB 培地 ($\text{NB} + \text{Mg}$ 培地)で 37°C 14 時間振盪培養した菌体を 20 ml の同培地に 2 ml 植菌し、 37°C で振盪培養する。細胞数が 1×10^8 細胞/ ml の濁度になれば遠心分離 ($7,200 \times g$ 、10分) で菌体を集め、 7 ml の $\text{NB} + \text{Mg}$ 培地に懸濁し、 $5 \times 10^{10} \phi 29$ ファージ粒子を加え、 37°C 45 分間保温する。遠心分離で菌体を集め 1 ml の $\text{NB} + \text{Mg}$ 培地に懸濁し、 $5 \times 10^{10} \phi 29$ ファージ粒子を加える。 37°C 1 時間保温後、更に $1 \times 10^{10} \phi 29$ ファージ粒子を加える。10 倍希釈し、 0.1 ml を $5 \times 10^9 \phi 29$ ファージ粒子と共に NB + Mg 寒天培地に塗沫し、 37°C 1 晩培養する。出現したコロニーを單一コロニー分離する。

DNA 含量の定量

$\text{x } \text{x } \text{x } \text{x } \text{x }$

-ス量を Burton の方法⁽³⁵⁾に従って測定し、DNA 含量を調べた。ジフェニルアミン溶液は ジフェニルアミン(和光純薬工業株式会社、大阪) 1.5 g 、酢酸 100 ml 、濃硫酸 1.5 ml から成る溶液 20 ml に 1.6% アセトアルデヒド 0.1 ml を加えて調製した。その 2.5 ml に 10 から $50\text{ }\mu\text{g}$ の DNA を含む DNA 溶液 1 ml を加え、16 時間 30°C 保溫した。保溫後、標準として 2-テ"オキシア"ノシンを用い $A_{600\text{ nm}}$ で濁度を測定した。

第3節 結果

1. 再生頻度に及ぼす血液増補剤の効果 再生培地中に含まれるゼラチン、馬血清および牛血清アルブミンには共通して血液増補作用がある。それゆえ、血液増補剤が一般にプロトプラストから正常な桿状生育細胞への再生を促進するかどうかを確かめた。上記以外の血液増補剤としてデキストランとポリビニルピロリドンを選び再生実験をおこなった。Bacillus subtilis 168S (trpC2, strA) の栄養細胞をリゾチーム処理してプロトプラストを得、浸透圧を調整した再生基礎培地 (HC 寒天培地) および 3 種の血液増補剤 (馬血清、ポリビニルピロリドンまたはデキストラン) を加えた HCH-10、HCP、および HCD 寒天培地にプロトプラストを塗沫し、30°C 4 日培養し出現するコロニー数を比較した。その結果、3% ポリビニルピロリドンを含む HCP-3 寒天培地で得られる再生頻度 (0.8 - 3.0 %) は既知血液増補剤 (馬血清) を含む HCH-10 寒天培地で得られる再生頻度 (1-2 %) とほぼ同程度で血液増補剤を含まない対照培地 (HC 寒天培地) と比べ 200 - 600 倍高いことを見い出した (表 1-2)。HCD-3 培地上でも 0.4 - 0.7 % の再生頻度が得られ、この値は HC 寒天培地のそれより 100 - 200 倍高い。

再生頻度は種々の因子 (例えば培養培地、増殖相、培養温度、希釈液、および遠心分離) によっても影響を

表1-2. Bacillus subtilis 168S プロトプラストの再生頻度に及ぼす血液増補剤の効果

寒天培地	再生頻度	
	実験1 ^a	実験2 ^b
HC	4.5×10^{-5}	3.6×10^{-5}
HCH-10	2.4×10^{-2}	1.3×10^{-2}
HCP-3	3.0×10^{-2}	8.3×10^{-3}
HCD-3	4.6×10^{-3}	7.2×10^{-3}

- a. プロトプラスト化以前の生菌数は $3.4 \times 10^8/ml$ で、浸透圧ショック耐性コロニーのプロトプラスト化後の数は $29/ml$ である。
- b. 生菌数は $1.8 \times 10^8/ml$ で浸透圧ショック耐性コロニー数は $15/ml$ である。

受ける。 B. subtilis YS II (purB6、arg-15、leuB8) および B. subtilis LMHA (purA16、leuA8、metB5、hisA3) の対数増殖期の細胞を集菌し、浸透圧を調整したリゾチーム溶液中に懸濁し、 42°C 60分ゆるやかに振盪した。試料を15分間隔で採取し、HCP-3およびHC 寒天培地に塗沫し、 30°C で4日培養し出現するコロニー数を調べた。図1-1は再生頻度と浸透圧耐性コロニーの出現頻度を示している。 B. subtilis YSII および LMHA 両方共 15分、30分、45分リゾチーム処理後 HCP-3 + アデニン寒天

再生体および浸透圧耐性コロニー数 (No./mℓ)

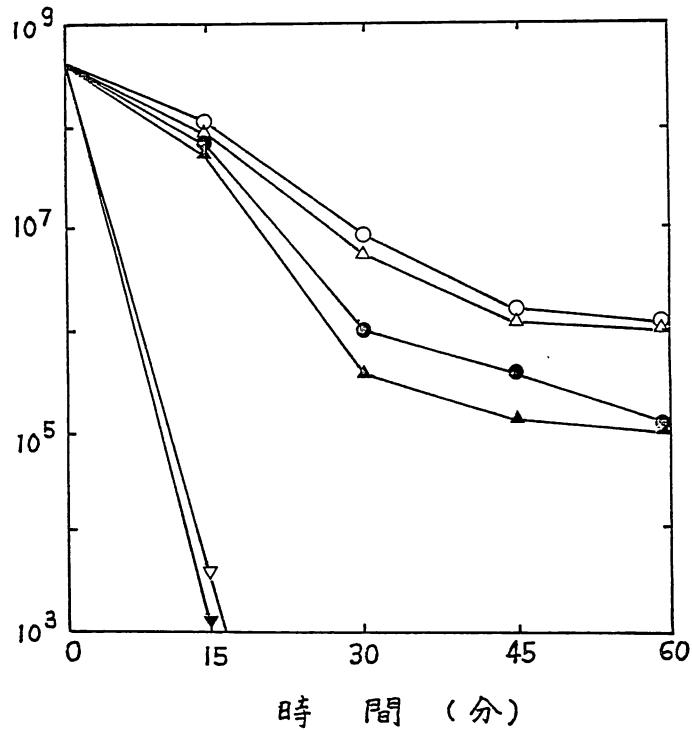


図1-1. リゾチーム処理による浸透圧耐性細胞数と再生体数の変化。 B. subtilis YSII および B. subtilis LMHA の対数増殖期細胞を $250\text{ }\mu\text{g/ml}$ リゾチームを含む高張溶液中に懸濁し、 42°C に保温した。試料を 15 分間隔でヒリアデニンを含む HCP-3 および HC 寒天培地上に塗沫した。 30°C 3-4日後、出現するコロニーを計数した。浸透圧耐性細胞: ∇ , YSII; ∇ , LMHA。再生体: \circ , YSII HCP-3 + アデニン培地; \bullet , YSII HC + アデニン培地; \triangle , LMHA HCP-3 + アデニン培地; \blacktriangle , LMHA HC + アデニン培地。

培地上に塗沫した。それぞれ 20-30%、2-3% および 0.4-0.5% の再生頻度が得られた。HCP-3 寒天培地上の再生頻度は 15 分後以外の試料では HC 培地上のそれより約 10 倍高い。一方両菌株からの浸透圧耐性細胞は 15 分後に生菌数当り 10^{-5} まで減少した(図 1-1)。また 15 分保温後に顕微鏡観察すると、球状細胞のみ観察された。

これらの結果は、ポリビニルピロリドンは B. subtilis の 3 菌株 (168S, YSII および LMHA) の再生頻度を増加させるが、最大の再生頻度ならびに再生促進率は菌株により異なることを示している。

2. ポリビニルピロリドンとデキストラン濃度の影響およびビニルピロリドンの再生阻害効果 B. subtilis
プロトプラストの再生頻度に及ぼすデキストランおよび
ポリビニルピロリドンの濃度の影響を調べるために表 1-3
に示す種々の再生培地を用いた。ポリビニルピロリドン
の 0.5% 以上が高頻度再生に必要であり、0.1% ポリビニ
ルピロリドンは効果的ではなかった。1% デキストラン
を含んだ HC 寒天培地上での、再生頻度は、対照の HC
寒天培地でのそれと比べ変化ない。ポリビニルピロリド
ンとデキストランをそれらのモノマー (ビニルピロリド
ンとグルコース) におきかえると、再生頻度の増加効果
は認められず、むしろビニルピロリドンの量が増加する
につれて顕著な再生率の減少が認められた(表 1-3)。

これらの結果より B. subtilis プロトプラストの高

表1-3. 再生頻度^aに関する血液増補剤およびそれらのモノマーの濃度の影響

実験 1		実験 2		実験 3	
寒天培地	再生頻度	寒天培地	再生頻度	寒天培地	再生頻度
HC	1.2×10^{-4}	HC	4.5×10^{-5}	HC	1.8×10^{-5}
HCP-0.1 ^b	1.9×10^{-3}	HCD-1	7.8×10^{-5}	HCGlu-3 ^c	8.2×10^{-6}
HCP-0.5	1.0×10^{-2}	HCD-3	4.6×10^{-3}	HCP-3	1.1×10^{-2}
HCP-1	1.0×10^{-2}				
HCP-3	1.9×10^{-2}				
HCV-0.1	7.6×10^{-4}				
HCV-0.5	2.5×10^{-5}				
HCV-1	$< 4.5 \times 10^{-7}$				
HCV-3	$< 4.5 \times 10^{-7}$				

a. 3回の実験結果を示した。これら実験の生菌数は $3.4 - 4.9 \times 10^8 / ml$ で浸透圧耐性細胞の出現頻度は 1.0×10^{-7} 以下である。

b. HCP-n寒天培地の「n」の値は化学薬品の%濃度を示している。例えばHCP-0.1およびHCV-0.1寒天培地はそれぞれ0.1%ポリビニルピロリドンと0.1%ビニルピロリドンを含む。

c. HCGlu-3寒天培地は培地1l当たりグルコース30gを加えた以外HC寒天培地と同じである。

い生存率を得るために血液増補作用を持つ高分子化合物の高濃度が必要であるようと思われる。

3. 血液増補剤と硬寒天による再生効果 ゼラチン、デキストラン、馬血清、牛血清アルブミンおよびポリビニルピロリドンは血液増補作用を持つ同一グループと考えられる。硬寒天の再生頻度増加効果を調べるために、対数増殖期細胞から調製した 168S 種のプロトプラストを、2.5% 寒天あるいは 3% ポリビニルピロリドンを含んだ HC 培地上に塗沫し、30°C 2-4日培養した。表 1-4 から 2.5% 寒天を含んだ HC 培地 (HC^{*} 培地) で得られる再生頻度は、HC 培地で得られたそれの 6-10 倍高いことを示している。このように、再生頻度の増加に対する硬寒天の効果は、血液増補剤のそれより低い。一方、2.5% 寒天と 3% ポリビニルピロリドンの両方を含んだ HC 培地 (HCP^{*}-3 培地) で得られた再生頻度 (0.1-0.2%) は、HCP-3 培地での値 (1.2-1.4%) よりも顕著に低い (表 1-4)。さらに HC^{*} および HCP^{*}-3 培地上では 2 日後にコロニーの大部分が出現し、かつほとんどの個々のコロニーは桿状細胞から成っており、残りは桿状細胞と L 型細胞の混合から成っている。これらの結果は、硬寒天はプロトプラストから桿状細胞への変換を促進し、コロニーの増殖を促進するという Landman らの報告⁽¹³⁾ と一致する。しかし、硬寒天のプロトプラスト生存に対する効果は、再生培地組成により異なっていた。

表 1-4. 血液増補剤と硬塞天との間の再生頻度に及ぼす効果の相違

寒天培地	再生頻度	
	実験 1	実験 2
HC	1.5×10^{-5}	2.2×10^{-5}
HC ^{*a}	1.4×10^{-4}	1.3×10^{-4}
HCP-3	1.4×10^{-2}	1.2×10^{-2}
HCP ^{*-3} ^a	1.0×10^{-3}	2.2×10^{-3}

a. HC^{*} および HCP^{*-3} 寒天培地は培地 1 l 当り 8 g の寒天の代わりに 25 g の寒天を含む以外 それぞれ HC と HCP-3 寒天培地と同じである。

4. 血液増補剤添加培地中におけるプロトプラストの出芽分裂 A. B. subtilis プロトプラストは、液体培地では再生しないが、トリプシン処理したプロトプラストは、10% ゼラチンを含んだ液体培地で再生することを Landman⁽³⁶⁾ ちは報告している。 B. subtilis 168 S プロトプラストを調製し、HCP-3 液体培地に懸濁後、30°C で培養した。5 時間後、細胞濃度およびプロトプラスト数は、培養開始時と比べ 1.5-1.6 倍であった。この結果は、プロトプラストが HCP-3 液体培地中で分裂していることを示している。4 種の液体培地中 (HC, HCP-3, HCD-3

および HCH-10 培地) で培養したプロトプラストの形態的変化を、光学顕微鏡下で調べた結果を図1-2に示した。4種培地中でプロトプラストは膨潤していたが、出芽による分裂は、血液増補剤を含む HC 培地中でのみ観察された(図1-2)。さらに分裂したプロトプラストは HCH-10 培地中で凝集していた。24時間培養後、桿状細胞は非常に稀に HCP-3、HCD-3 および HCH-10 培地で認められた。しかし桿状細胞の割合は、10%ゼラチン培地中で報告されている結果と比べると極端に低い。以上の結果より、血液増補剤は膨潤したプロトプラストが、出芽一分裂する際に影響を与えると結論した。

5. 再生頻度に及ぼすカサミノ酸の影響 B.

subtilis 1685 より調製したプロトプラストを、HCP-3 液体培地で 30°C 3 時間静置培養した。この液体培養プロトプラストを遠心分離 ($4,000 \times g$ 、10分) で集め、HMP-3 培地で洗浄後、HMP-3 培地に懸濁した。懸濁液を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ L-トリプロトファンを含む HMP-3 寒天培地 (HMP-3 + L-トリプロトファン) およびカサミノ酸濃度を変えた以外 HCP-3 培地と同じ HCⁿP-3 寒天培地に塗沫し再生頻度を調べた(表1-5)。L-トリプロトファン添加 HMP-3 寒天培地で得られた再生頻度 (3.6×10^{-4}) は、HCP-3 培地のそれ (3.2×10^{-2}) より約 100 倍低い。さらに再生培地中のカサミノ酸量が 10 mg/l 以下になると、再生頻度が減少した。一方、プロトプラストを HCP-3 培地、30°C、3 時間

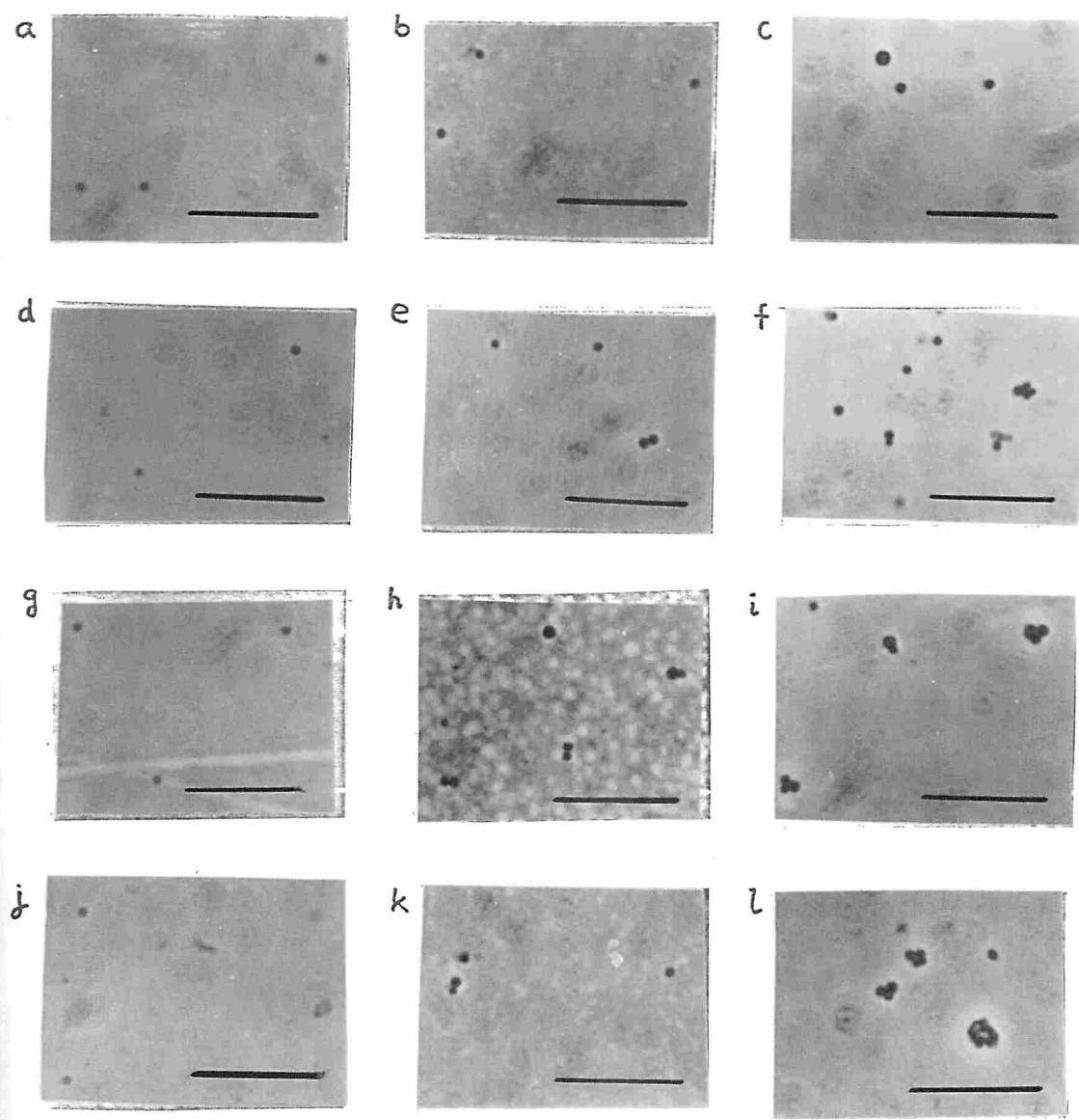


図1-2. HC, HCP-3, HCD-3 または HCH-10 液体培地中の *B. subtilis* 168S プロトプラスト および 分裂中のプロトプラストの光学顕微鏡写真。プロトプラストを HC, HCP-3, HCD-3 および HCH-10 培地中で 1.5 時間, 7.5 時間 および 13.5 時間 培養した。記号: a, HC 培地 1.5 時間 培養; b, HC 培地 7.5 時間 培養; c, HC 培地 13.5 時間 培養; d, HCP-3 培地 1.5 時間 培養; e, HCP-3 培地 7.5 時間 培養; f, HCP-3 培地 13.5 時間 培養; g, HCD-3 培地 1.5 時間; h, HCD-3 培地 7.5 時間; i, HCD-3 培地 13.5 時間; j, HCH-10 培地 1.5 時間; k, HCH-10 培地 7.5 時間; l, HCH-10 培地 13.5 時間。バーの長さは $10\mu\text{m}$ を示す。

表 1-5. 再生頻度^aに及ぼすカザミノ酸の影響

寒天培地	再生頻度		
	実験 1	実験 2	実験 3
HCP-3	2.2×10^{-2}	3.2×10^{-2}	5.3×10^{-2}
HC ^a P-3	3.0×10^{-2}	3.8×10^{-2}	
HC ^b P-3	1.7×10^{-2}	3.3×10^{-2}	
HC ^c P-3			3.8×10^{-2}
HC ^d P-3			1.0×10^{-2}
HC ^e P-3 ^{c,d}	1.4×10^{-2}	5.6×10^{-3}	
HMP-3 + L-trp ^{c,e}	2.8×10^{-4}	3.6×10^{-4}	

a. 3 実験の結果が示してある。生菌数は $2.3 - 2.8 \times 10^8 / ml$ の範囲であり、浸透圧耐性細胞の出現頻度は 2.2×10^{-7} 以下である。

b. HC^eP-3 寒天培地の記号「n」はカザミノ酸の濃度を示す。「a」「b」「c」「d」および「e」はそれぞれ 500、50、20、10、および 5 mg/l を示す。

c. HC^eP-3 および L-トリプトファン添加 HMP-3 寒天培地上で桿状細胞は非常に遅く出現した。それゆえ、これら培地上の再生頻度は 7 日培養後出現した再生体数を用いて求めた。

d. HC^eP-3 寒天培地上の再生頻度は、 $(NH_4)_2SO_4$ 2g とフェン酸ナトリウム 1g を培地 1l 当り加えた HC^eP-3 培地 (HC^eP-3 寒天培地) 上で得られる値と同じである。

e. 100 µg/ml L-トリプトファンを HMP-3 寒天培地に加えた。

保温せずに、直接 L-トリプトファン添加 HMP-3 培地に塗沫したとき、極端に再生頻度は低い (2×10^{-7})。

カザミノ酸の役割は、現在までに明確にされていないが、幾つかの可能性が挙げられる。それは (1) 調製中に損傷を受けたプロトプラストの保護に役立つ。(2) カザミノ酸または血液増補剤無添加の液体培地中で、プロトプラストは分裂しないことから、血液増補剤添加は L型細胞の増殖を可能とする。(3) カザミノ酸は L型細胞あるいはプロトプラストから桿状細胞への変換を促進する。カザミノ酸は一般的な細胞代謝を活発化し、再生をうながす、などの効果を持つようと思われる。

$(NH_4)_2SO_4$ 2g ヒクエン酸ナトリウム 1g を HC^CP-3 培地 1l 当り加えた HC^{*P} 培地を再生の準最少培地として選んだ。なぜならば、L-トリプトファン要求性株以外のオーキソトロフは、20 mg/l 濃度のカザミノ酸を含む HC^{*P} 培地で全く増殖しない。アミノ酸要求性遺伝子を指標として、プロトプラスト融合より得られる組換え体を、この培地を使って直接選択できることを見い出した(第3章 第3節)。

6. 血液増補剤を含まない再生培地でも高頻度に再生する突然変異体の分離 カザミノ酸以外の再生を促進する物質(血液増補剤)を含まない HC 寒天培地では B. subtilis のプロトプラストの再生はほとんど認められない。HC 寒天培地でも高頻度に再生する突然変異体の

分離を試みた。 B. subtilis YS11 (purB6、arg-15、leuB8) 营養細胞を NTG 突然変異処理し、リゾチーム処理後アデニンを添加した HC 寒天培地に塗沫した。30°C 4日後に出現した再生体を 100-200 コロニー集め、混合培養後、リゾチーム処理、アデニン添加 HC 寒天培地の塗沫操作を更にもう一度行い、4個の高頻度再生突然変異体 (AG-5、AH-6、AH-8 および AA-7) を分離した(表1-6)。 AH-8 および AA-7 突然変異体より調製したプロトプラストは、HC 培地上で突然変異体の親株 YS11 と比べると 3-30 倍高頻度に再生する。しかし、アデニンを添加した HC 培地にポリビニルピロリドンを添加しても変化なく、再生頻度は親株と同程度かいくぶん低い。それに反して、残り 2 個の突然変異体 (AG-5 および AH-6) は前記 2 株よりもアデニン添加 HC 培地上で再生頻度 (2% - 7%) が顕著に高く、アデニン添加 HCP-3 寒天培地上で 100% の再生頻度を示した。浸透圧を調整した最少培地 (アデニン添加 HMP-3 培地) 上で、AG-5 のプロトプラストは 0.5% の頻度で再生するが、AH-6 のプロトプラストの再生は顕著でなかった。このように 4 個の突然変異体は互いに異なる性質を有していた。 HC 寒天培地で高頻度に再生する突然変異体 AG-5、AH-6、AH-8、および AA-7 をそれぞれ rgn-1、rgn-2、rgn-3 および rgn-4 突然変異体と称した。

表1-6. rgn 突然変異体 (AG-5, AH-6, AH-8 および AA-7) とその親株 (YSII) の諸性質

	菌 株				
	YSII	AG-5	AH-6	AH-8	AA-7
再生頻度(%)					
アデニン添加 HC	0.03	7.0	2.2	0.10	0.86
アデニン添加 HCP-3	1.3	109	100	0.18	1.5
アデニン添加 HMP-3	$< 2 \times 10^{-5}$	0.5	$< 10^{-4}$	$< 2 \times 10^{-5}$	$< 10^{-5}$
フージ感受性					
Φ29	+ ^a	+	+	+	+
PBSI	+ ^a	- ^b	-	+	+
ガラクトース培地 での増殖	+ ^c	+	+	+	+

- a. バクテリオフージ Φ29 または PBSI に対する感受性を示す。
- b. PBSI フージに対する抵抗性を示す。
- c. 単一炭素源としてガラクトースを用いた Spizizen 最少寒天培地上で増殖

7. rgn と既知再生突然変異 gta との比較 細胞壁中のテイコ酸のグルコシル化に関与し、Φ29 フージに耐性を示す gta 突然変異体 (gtaA, gtaB および gtaC) は、B. subtilis プロトプラストの再生頻度が高いことを De Castro-Costa と Landman らは報告している。⁽³⁶⁾ gtaC

突然変異体はガラクトース炭素源培地で溶菌する。B. subtilis YS11 から $\phi 29$ フージ耐性突然変異体 5 株を分離しアデニン添加 HC およびアデニン添加 HCP-3 寒天培地で再生頻度を調べた。これら突然変異体は YS11 に比べ再生頻度がアデニン添加 HC 寒天培地上で 7-13 倍、アデニン添加 HCP-3 寒天培地上で 4-14 倍高くなっていた。すなわち、 $\phi 29$ フージ耐性突然変異体 (PRA1-PRA5) の再生頻度増加は、AG-5 および AH-6 突然変異体のそれより約 10 倍低い。一方 rgn 突然変異体は $\phi 29$ フージ感受性で、ガラクトース炭素源培地で増殖した (表 1-6)。これらの結果は、rgn 突然変異は gta 突然変異と異なることを示している。

8. rgn 遺伝子の遺伝子座位 rgn 突然変異遺伝子の座位決定のために、一般形質導入フージ PBS1 を感染させた。しかしながら、AG-5 および AH-6 は表 1-6 に示したように PBS1 フージに対し耐性を示した。さらに AG-5 および AH-6 突然変異体は鞭毛を有せず (図 1-3) 運動性も示さない。隔壁合成が遅れるため桿菌の長さが長くなりかつコンピテントな細胞も得られなかつた。これらの多面発現は次の理由により rgn 突然変異により生じると考えられる。AG-5 突然変異体より運動性を有する復帰突然変異体 (DC4) を突然変異処理せずして分離したところ、鞭毛を有レ (図 1-3)、PBS1 フージに感受性で、かつアデニン添加 HC およびアデニン添加 HCP-3 寒

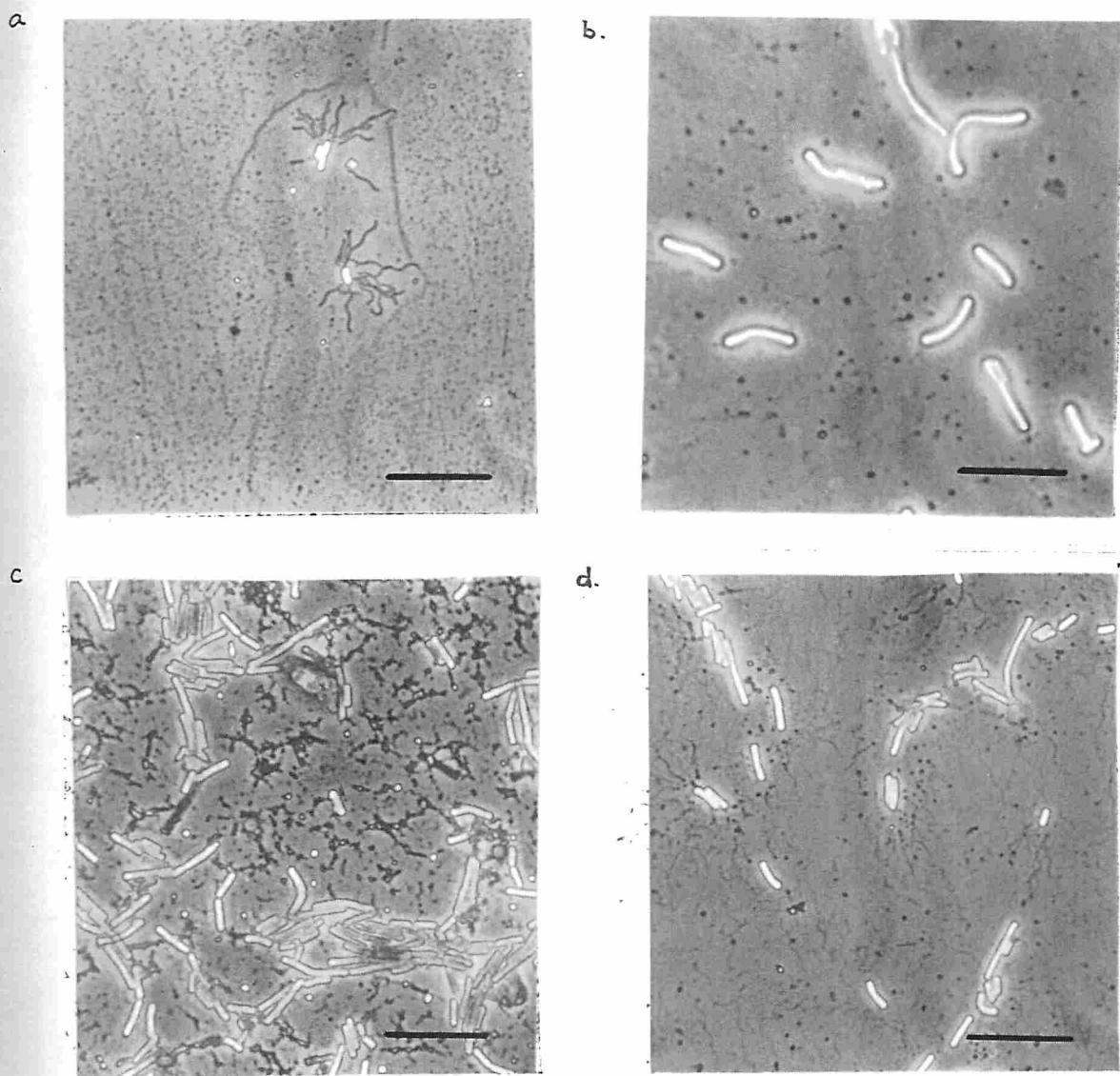


図1-3. 親株 (YSII)、rgn-1 突然変異体 (AG-5)、rgn-2 突然変異体 (AH-6) および rgn-1 突然変異体の復帰突然変異体 (DC4) の鞭毛染色後の光学顕微鏡写真。NA 培地上で 30°C 14 時間培養した試験菌体を実験材料と実験方法で述べたように鞭毛染色した。記号と菌株: a, YSII; b, AG-5; c, AH-6; d, DC4。バーの長さは 10 μm を示す。

天培地の再生頻度が親株、YSII, と同程度まで低下していく。AG-5 株の rgn-1 遺伝子の位置をプロトプラス細胞融合法（第3章 第3節2）による連関の検索で調べ、purA と連関が、strA と強い連関があることがわかった。さらに詳細な rgn-1 遺伝子の位置づけをするために *B. subtilis* CT10-1 (cysA14, strA, hisH2) よりコンピュント細胞を調製し、0.01 μg の AG-5 DNA (purB6, arg-15, leuB8, rgn-1) による形質転換を行い 300 個の Cys⁺ 形質転換体を得た（表1-7）。非選択符号（hisH, strA, rgn-1）の分離を調べたところ表1-7 に示すように 41 個の Rgn⁻ 同時形質転換体を認めた。一方 cysA と連関のない hisH 符号の同時組換体は認められなかった。これらの結果は rgn-1 遺伝子と cysA 遺伝子は連関していることを示している。さらに Cys⁺ Str^r Rgn⁻ 形質転換体が 300 個中 26 個出現していることは rgn-1 - cysA14 - strA の遺伝子配列であることを強く示唆する。cysA 遺伝子と AH-6 株の rgn-2 突然変異遺伝子との間の連関関係も認められた（表1-7）。

9. x rgn x 突然変異体の諸性質 De Castro-Costa と Landman は、再生ペプチドグリカンの合成ヒオートリシンによるペプチドグリカン分解の平衡関係がペプチドグリカンの合成側に偏ったときに生じる、という作業仮説⁽³⁶⁾ を提出している。*B. subtilis* YSII, AG-5 および AG-5 より分離した Rgn⁺ 復帰突然変異体, DC4 のオ-

表1-7。形質転換^aによるrgn-1の隣接関連遺伝子(cysAとstrA)との連関関係

供与菌 (菌株)	受容菌 (菌株)	遺伝子型	選択 符号	組換元体 クラス	推定される 配列
<u>purB arg-15</u>	<u>cysA hisH</u>	Cys ⁺		Str ^r Rgn ⁺ ^b	<u>rgn-1</u>
<u>leuB rgn-1</u> (AG-5)	<u>strA</u> (CT10-1)			Str ^r Rgn ⁻ ^b	<u>cysA</u>
				Str ^s Rgn ⁺	<u>strA</u>
				Str ^s Rgn ⁻	
			計		300
<u>purB arg-15</u>	<u>cysA hisH</u>	Cys ⁺		Str ^r Rgn ⁺	<u>rgn-1</u>
<u>leuB rgn-2</u> (AH-6)	<u>strA</u> (CT10-1)			Str ^r Rgn ⁻	<u>cysA</u>
				Str ^s Rgn ⁺	<u>strA</u>
				Str ^s Rgn ⁻	
			計		100

a. 供与菌 DNA濃度は $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。

b. Rgn の表現型は運動性ならびに NB 培地中 37°C 振盪培養での形態で調べた。すなわち、Rgn⁻ 株は非運動性でかつ細胞が長い。

トリシン活性を測定した。AG-5 のオートリシン活性は親株, YSII, と比べ、約 15% に減少していた(図1-4)。一方 DC4 株は YSII の約 80% に回復していた。YSII, AG-5 および DC4 株の細胞壁から LiCl 处理で抽出したオートリシ

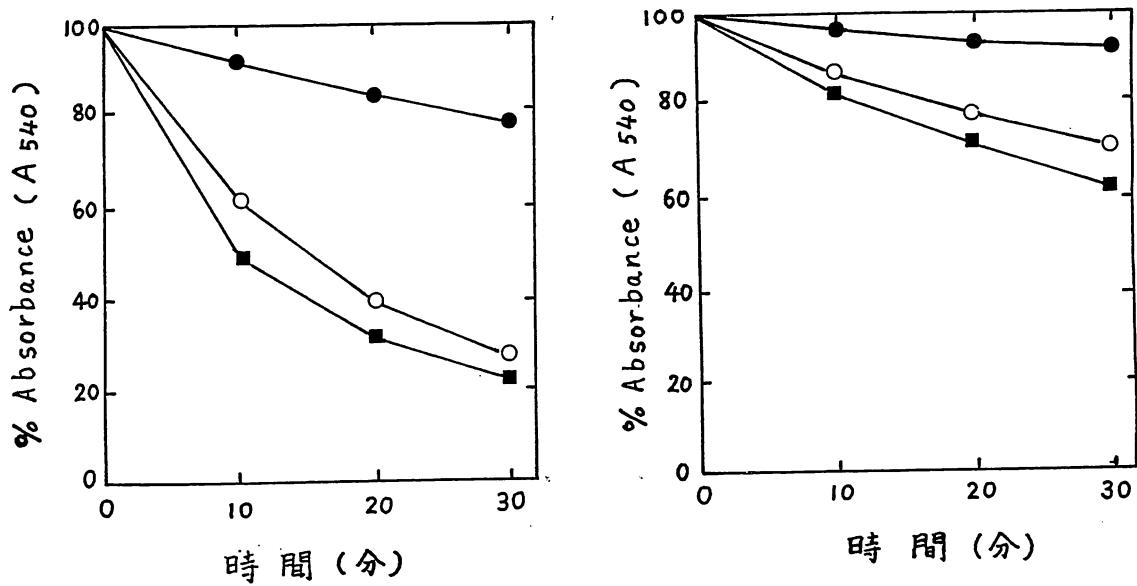


図1-4. 親株(YSII)、*rgn-1* 突然変異体(AG-5)および復帰突然変異体(DC4)における細胞壁結合オートリシンならびに細胞壁からLiClで抽出したオートリシンの活性。(A) 細胞壁に結合しているオートリシン；(B)細胞壁からLiClで抽出したオートリシン。図1-4Bにおいて活性測定反応液中のオートリシンと細胞壁は同じ菌株から調製した。記号: ■, YSII; ●, AG-5; ○, DC4.

ン活性測定も同じ結果を得た(図1-4)。以上の結果は、De Castro-Costa と Landman の仮説と矛盾しない。起源の異なる細胞壁とオートリシンを組合せてオートリシン活性を測定した。AG-5の細胞壁は、YSIIおよびDC4のそれと比べオートリシン(YSIIおよびDC4株より抽出)に対し1.2倍感受性であった。すなわち、AG-5突然変

異体は、細胞壁の構造も変化していると考えられる。

rgn-1 突然変異は、以上のように細胞壁構造やその生理的諸性質に変化が見られる。そこで次に菌体外酵素

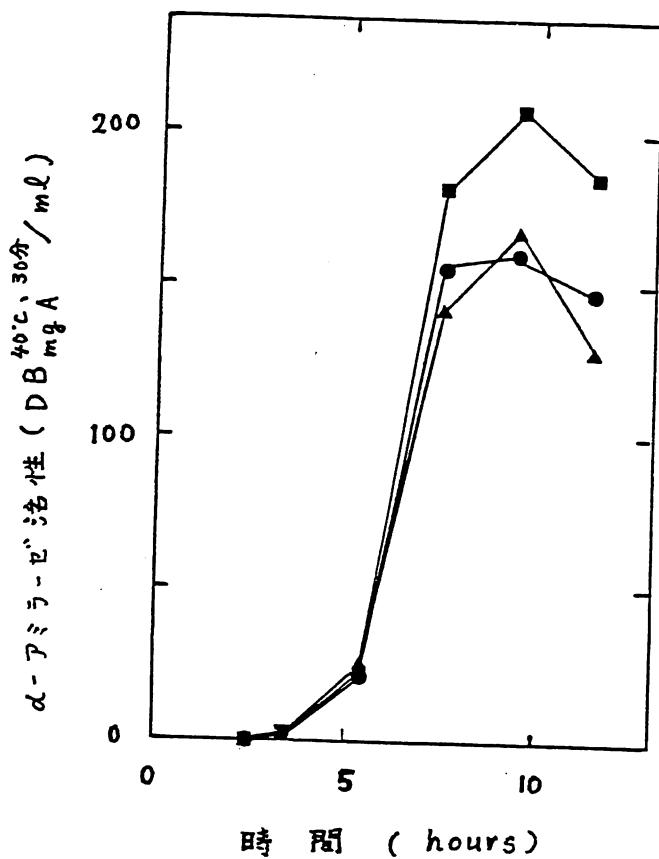


図 1-5. 野生株と rgn-1 突然変異における α -アミラーゼ生産性。
 α -アミラーゼ合成は 37°C NB 培地において調べた。rgn-1 突然変異以外同じ遺伝子型の形質転換体は CT6-1 (cysA¹⁴、hisH2) 受容菌の AG-5 DNA (purB6、arg-15、leuB8、rgn-1) による Cys^+ 形質転換より得た。
記号: ●, CT11-2 (hisH2); ■, CT11-6 (hisH2, rgn-1); ▲, CT11-12 (hisH2, rgn-1)。

(α -アミラーゼおよびプロテアーゼ) の活性変化を調べた。図1-5 および図1-6 に示すように rgn-1 突然変異はプロテアーゼ生産に対しては、酵素生産の誘導時期が早くなり、しかも活性が約3-4倍高くなっていた。

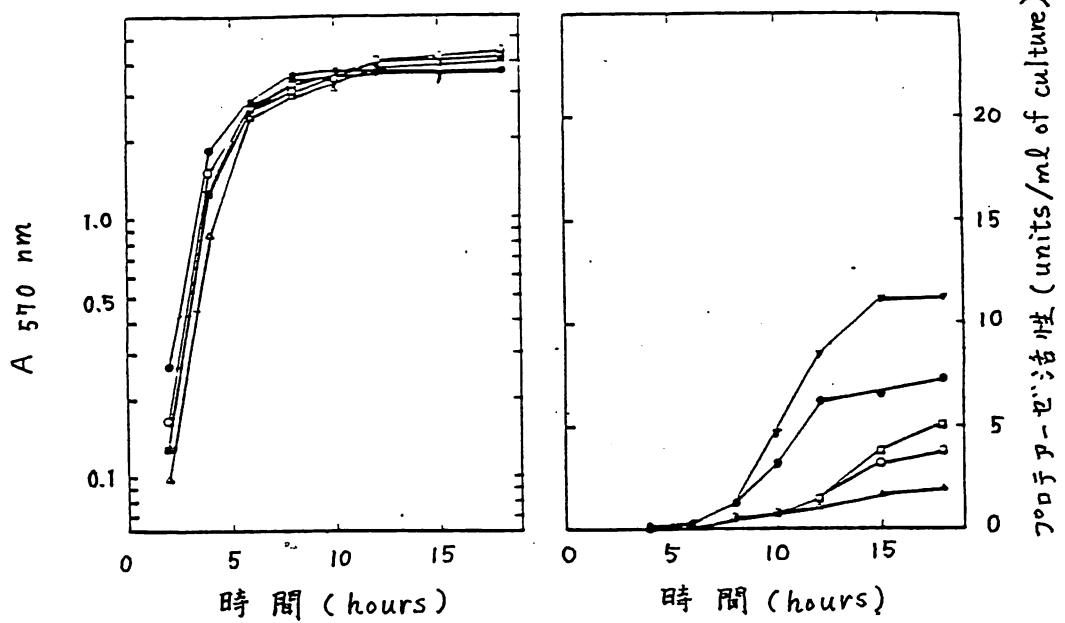


図1-6. rgn 突然変異体のプロテアーゼ生産性。
試験菌を 37°C で NB 培地で振盪培養した。酵素活性は粗酵素液として培養ろ液を用い時間の関数として表わした。菌株および記号: ○, 親株 (YSII); ●, rgn-1 変異体 (AG-5); ▽, rgn-2 変異体 (AH-6); □, rgn-3 変異体 (AH-8); △, rgn-4 変異体 (AA-7)。

第4節 考察

血液増補剤は、血液中の浸透圧の維持、鉄、色素、数種の可溶性ビタミンや薬剤等の物質と結合し、これらの輸送に関与している。B. subtilisにおける再生培地に対し、しばしば使用される3種の物質（ゼラチン、馬血清と牛血清アルブミン）は、いずれも血液増補剤として使用されてるので他の血液増補剤、ポリビニルピロリドンとデキストラン、のプロトプラス生育促進効果を液体培地および固形培地で調べた。馬血清、ポリビニルピロリドンおよびデキストランは100-1000倍高頻度にプロトプラスの生存を促進した（表1-2）。コロニーの大部分は血液増補剤を含んだHC寒天培地上でゆっくりと出現する（30°C、4日後）。プロトプラスから桿状細胞への変換を促進する硬寒天上では、再生頻度は血液増補剤を含んだHC培地より低いが（表1-4）、個々のコロニーの大部分は桿状細胞のみから成っていた。血液増補剤を含んだ液体培地中で、プロトプラスは膨潤し、分裂するが（図1-2）、培養24時間後でさえ桿状細胞を見出することは稀であった。血液増補剤無添加の液体培地中では、プロトプラスは膨潤するだけであった。以上の結果は、血液増補剤は、プロトプラスの生育を促進し、その結果、再生体数の収率が増加することを強く示唆している。

プロトプラスト形成については、42°C 45分のリゾチーム（250 µg/ml 最終濃度）処理まで、再生体出現頻度は急激に減少するけれども、その後さらに15分処理時間を加えても再生頻度は下らない。42°Cでの保温中にプロトプラストが熱損傷を受け、その結果、再生頻度が1%前後になるとすると、この結果は説明できない。

Chang と Cohen⁽⁹⁾はリゾチーム（2mg/ml）を含むサッカロース-マレイン酸-ペナセイ緩衝液中 37°C 2時間保温後、リゾチーム処理前の生菌数当り 10-25%で再生体を得ることができたと報告している。他方、リゾチーム（100 µg/ml）を含んだサッカロース-マレイン酸-牛血清アルブミン緩衝液中 42°C 30分保温後、最も高い再生頻度（プロトプラスト当り 100% 生存率）が Gabor と Hotchkiss によって報告されている。⁽³⁷⁾ 両実験とも血液増補剤（牛血清アルブミンまたはゼラチンヒ子牛血清）が再生培地に加えられていた。本研究での成果を Gabor と Hotchkiss の結果と比較すると、リゾチーム（250 µg/ml）を含むサッカロース-マレイン酸緩衝液中 42°C 30分処理後、馬血清またはポリビニルピロリドンを含む再生培地上で再生率は約10%で少し低いように思われる。しかしながら、再生頻度の差はプロトプラスト作成条件の違い、再生培地の組成に依存しているほか、使用菌体の遺伝背景によっても大いに支配されていることを指摘できる。同じ実験条件下で B. subtilis 168 S の再生頻度は B. subtilis YSII および B. subtilis LMHA の値よ

りも約10倍高く（表1-2 および図1-1）、またAG-5突然変異体は、HCP培地上で100%再生率を示すようになる。

B. megaterium プロトプラストの再生用に開発された再生培地^(38,39)はゼラチンおよびカザミノ酸を含んでいない。本実験で使用した条件では B. megaterium の再生は充分ではないが、B. licheniformis プロトプラストに対しては効果的である（第2章第3節2参照）。これらのこととは、それぞれの Bacillus 属細菌のプロトプラストの生育および再生条件は異なることを示している。

B. subtilis のプロトプラスト再生は液体培地中では頻繁には起こらない。液体培地中で、B. megaterium プロトプラストの再生は、以下の様式で起こると Hadlaczky ら⁽³⁹⁾は報告している：(i)個々のプロトプラストの体積の増加、(ii)プロトプラストの分裂、(iii)桿状細胞への復帰である。もし B. subtilis の再生がこれと同じであれば、血液増補剤は(i)から(ii)への変換を促進すると考えられる。

B. subtilis YSII よりNTG処理によりポリビニルピロリドン無添加再生培地上でも高頻度に再生する突然変異体を4株（AG-5、AH-6、AH-8 およびAA-7）得た。これら4株の突然変異体（rgn突然変異体）は、HCP-3+ade 寒天培地上の再生頻度、PBS1 フージ感受性等の比較より2群に分けることができた。AG-5 およびAH-6 はポリビニルピロリドンを添加している HCP-3+ade 培地上で再生率100%を示し、鞭毛を有せず、運動性がなく、PBS1 フージに耐性、隔壁合成が遅いなど

多面発現の性質を持つ。さらに細胞壁の組成が変化し、オートリシン活性の低下ならびにプロテアーゼ生産性など細胞壁や一部菌体外酵素の生産性に対する影響を及ぼす。

cysA 遺伝子に連関したこれら rgn-1 と rgn-2 突然変異は既知高頻度再生突然変異遺伝子である gtaA および gtaB (いずれも estB 遺伝子に連関) と gtaC (glyB 遺伝子に連関) とは、 $\phi 29$ および PBS1 ファージに対する抵抗性が互いに異なる。一方、オートリシン活性が低下し、かつ鞭毛欠損を持つ 2 種の突然変異 (lyt および pap) が知られている。^(40, 41) しかしながら、次の理由から rgn-1 は上記遺伝子の突然変異ではないと考えられる: (i) pap 遺伝子は uvrA 遺伝子と連関し遺伝子座が異なる, (ii) lyt 突然変異はコンピテントな状態を失なわせない, (iii) 最近 lyt-1 および lyt-2 は aroD 遺伝子と、また lyt-15 は hisA 遺伝子と連関していることを見出したため。

第5節 要約

Bacillus subtilis プロトプラストは、馬血清、牛血清アルブミン、ゼラチン、ポリビニルピロリドンまたはデキストランを含んだ浸透圧調整培地で桿状生育細胞へ復帰する。培地 1 ℥当たり 30 g ポリビニルピロリドンと

20 mg カザミノ酸を含んだ培地は、プロトトロフの再生に特に有効である。ポリビニルヒロリドン、デキストランおよび馬血清は液体培地中プロトプラストの分裂を促進し、寒天培地上でプロトプラストの生存率を高めた。血液増補剤を含まない再生培地上でも、高頻度で再生可能な突然変異体 (AG-5, AH-6, AH-8 および AA-7) を分離した。これらの中、AG-5 および AH-6 突然変異 (rgn-1 および rgn-2) は多面発現の性質 (PBSI フージに耐性、非運動性、コンピテント能を欠くおよび隔壁合成がおそい) を持ち、B. subtilis 染色体上 cysA 遺伝子に連関していた。また AG-5 と AH-6 はポリビニルヒロリドン含有再生培地上でほぼ 100% 再生し、オートリシン活性、プロテアーゼ生産性、誘導性に変化が見られた。

第2章 プロトプラスト形質転換および挿入不活性ベクタープラスミドの作製

第1節 緒言

Bacillus subtilis におけるクローン化実験でプラスミド DNA による形質転換は最も重要な方法の一つである。

B. subtilis Marburg 株のコンピテント細胞の宿主 DNA による形質転換は古くから知られており、⁽²⁶⁾ μg DNA 当り約 10^7 個の組換え体が得られ、1 個の組換え体が出現するのに必要な DNA 分子数はおよそ 2×10^3 と計算される。一方、プラスミド DNA を使用すると μg DNA 当り約 10^5 個の形質転換体が得られ、^(11, 42-45) 形質転換効率は 2×10^6 分子当り 1 個である。さらに DNA 濃度増加による形質転換体の増加が $0.1 \mu\text{g}$ DNA 以下でも飽和することがあり、 $1 \mu\text{g}$ DNA を用いて得られる転換体の絶対数はさらに低くなる。このような低い形質転換効率を改良するために、1979 年 Chang & Cohen⁽⁹⁾ はプロトプラスト形質転換法を開発した。

その後、数種の Bacillus 属プロトプラストについて形質転換が報告されている。⁽⁴⁶⁻⁵¹⁾ しかし、同じプラスミド DNA による異種 Bacillus 属プロトプラスト形質転換の比較、プロトプラスト化の程度と形質転換頻度との関係は調べられていない。この章では、種々の Bacillus 属細菌

における pTP4 プラスミド DNA によるプロトプラスト形質転換、pTP4 プラスミドの Bacillus 属に対するクローニングベクターとしての有用性、B. subtilis 宿主菌に依存したプロトプラスト形質転換時のプラスミド DNA の欠失現象ならびに挿入不活性ベクター プラスミドの作製について論ずる。

第2節 実験材料と実験方法

菌株およびプラスミド 使用した菌株およびプラスミドのリストを表2-1に示す。B. subtilis YS11、B. amyloliquefaciens 23843⁽¹⁸⁾、B. licheniformis FD0120⁽¹⁸⁾、B. megaterium IAM1030⁽¹⁸⁾ および B. pumilus IF012110⁽¹⁸⁾ はクロラムフェニコール耐性プラスミド、pTP4、DNA による形質転換の受容菌として用いた。また B. subtilis RM125⁽⁵²⁾、B. subtilis MII12⁽⁵²⁾、B. subtilis LMHA および B. subtilis 168S はプラスミド pJKK523⁽⁵³⁾ および pJKK310⁽⁵³⁾ による形質転換の受容菌として用いた。pTP4 プラスミド DNA は、B. subtilis LMHA の形質転換体から分離し、pJKK523 および pJKK310 プラスミド DNA は Escherichia coli C600 r_Km_K (thr, leu, thi, gal, hsdM, hsdR) の形質転換体から分離した。E. coli プラスミド pBR322⁽⁵⁶⁾ と、Staphylococcus aureus プラスミド pC221⁽⁵⁷⁾ より成る pJKK523、および E. coli プラスミド pBR325⁽⁵⁸⁾ と S.

表 2-1。菌株およびプラスミドのリスト

菌株およびプラスミド	遺伝子型	起源および由来
菌株		
<u>B. subtilis</u>		
1685	<u>trpC2</u> , <u>strA</u>	第1章
YS11	<u>purB6</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u>	第1章
LMHA	<u>purA16</u> , <u>hisA3</u> , <u>leuA8</u> , <u>metB5</u>	第1章
RM125	<u>arg-15</u> , <u>leuB8</u> , <u>r_M-m_M-</u>	別府 輝彦 教授
MI112	<u>thr-5</u> , <u>arg-15</u> , <u>leuB8</u> , <u>recE4</u> <u>r_M-m_M-</u>	関 達治 博士
<u>B. amyloliquefaciens</u>		
23843	<u>wild-type</u>	関 達治 博士
<u>B. licheniformis</u>		
FD 0120	<u>met-1</u> , <u>pepA1</u>	関 達治 博士
<u>B. megaterium</u>		
IAM 1030	<u>wild-type</u>	関 達治 博士
FM 4	<u>ilv-1</u> , <u>arg-1</u>	IAM 1030 より NTG処理 して得た <u>Ilv-</u> <u>Arg-</u> 突然 変異体
<u>B. pumilus</u>		
IFO 12110	<u>wild-type</u>	関 達治 博士
<u>E. coli</u>		
C600 r _K m _K	<u>thr</u> , <u>leu</u> , <u>thi</u> , <u>gal</u> , <u>hsdR</u> , <u>hsdM</u>	関 達治 博士
HB101	<u>pro</u> , <u>leu</u> , <u>thi</u> , <u>lac</u> , <u>rpsL</u> <u>hsdR</u> , <u>hsdM</u> , <u>recA</u> , <u>endoI</u>	関 達治 博士 (60)
プラスミド		
pTP4	<u>cam</u>	河野 恵 教授
pJKK310 ^a	<u>kan</u> , <u>amp</u> , <u>tet</u>	岡田 弘輔 教授
pJKK523 ^b	<u>cam</u> , <u>amp</u> , <u>tet</u>	岡田 弘輔 教授

- a. E. coli プラスミド pBR325 (Ap^r, Tc^r, Cm^r) と S. aureus プラスミド pUB110 (Km^r) との EcoR1 切断、再結合したプラスミド。
- b. E. coli プラスミド pBR322 (Ap^r, Tc^r) と S. aureus プラスミド pC221 (Cm^r) との EcoR1 切断、再結合したプラスミド。

aureus プラスミド pUB110^(45,59) より成る pJKK310 プラスミドは、岡田弘輔教授より、また B. subtilis RM125 は、別府禪彦教授より分譲を受けた。

培地 pTP4 プラスミドを持つ Bacillus 属を選択する場合、NB 培地、HCP-3 培地およびアデニン添加 HCP-3 培地（第1章 第2節参照）にクロラムフェニコールを最終濃度で $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ もしくは $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した。pJKK523 プラスミドの場合には、クロラムフェニコールを最終濃度で $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した。カナマイシン耐性プラスミド pJKK310 を選択する時、それぞれ NB 培地には $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、HCP 培地には $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 最終濃度でカナマイシンを加えた。テトラサイクリンおよびアンピシリンは、それぞれ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ と $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で添加した。

プラスミド DNA の調製 CsCl-EtBr 平衡密度勾配遠心分離で大量に DNA を調製する場合は、Guerry らの方法⁽⁶¹⁾ で上清溶菌液を調製し、Matsubara らの方法⁽⁶²⁾ でプラスミド DNA を精製した。抗生素質を含む NB 培地で 37°C 14 時間振盪培養したプラスミド含有菌体の培養液を、1,000 ml の NB 培地に 10 ml 植菌し、 37°C で対数増殖期後期 ($A_{570\text{ nm}} = 0.8$) まで振盪培養する。E. coli C600 rkm⁻ (pJKK523) および E. coli C600 rkm⁻ (pJKK310) の場合には、最終濃度が $170 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにクロラムフェニコールを加えて、 37°C でさらに 14 時間振盪培養

する。菌体を遠心分離 ($4,000 \times g$, 10分) で集め、10mlの0.5M NaCl-0.1M EDTA, pH8.0 で洗浄する。洗浄菌体を10ml の緩衝液A [25% サッカロース-0.05M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、pH8.0]に懸濁する。2ml のリゾチーム溶液 (10mg リゾチーム-0.25M トリス, pH8.0)を加え、5分間氷中におく。反応液に4mlの0.25M EDTA, pH8.0を加え、さらに30分間 (*E. coli* の場合は5分間) 氷中におく。4mlのSDS溶液 (5% SDS-0.25M トリス、pH8.0)を加え、続いて5mlの5M NaClを加え、4°Cで14時間放置する。85,000 × g, 30分遠心分離して得た上澄みを上清溶菌液と呼ぶ。溶菌液をTE緩衝液 (10mM トリス-1mM EDTA, pH8.0)で14時間4°Cで透析後、溶菌液の3/4量のフェノールを加え、室温で10-20分間ゆるやかに振盪した後、2,000 × g, 10分遠心分離し、水層に2倍量のエチルアルコール (-40°C)を加え、14時間放置する。沈殿にTE緩衝液を加え溶解させ、最終濃度で200 μg/mlとなるようRNase Aの溶液 (20 mg/ml RNase A-0.05M 酢酸緩衝液, pH5.0)を加え37°C 1時間反応し、フェノール処理、エチルアルコール沈殿し、DNAをTE緩衝液にとかす。その4.76 mlに塩化セシウム 5g, 4.6 mg/ml 臭化エチジウム 0.5 mlを加え、150,000 × g, 48時間4°Cで遠心分離し、プラスミドDNAの部分を注射器にて採取し、イソプロピルアルコールによる抽出操作で臭化エチジウムを除き、TE緩衝液で3回、各8時間透析後、エチルアルコール沈殿によりDNAを集め、TE緩衝液にとかし

保存する。

数多くの菌体からプラスミドDNAを検索する場合には、BirnboimとDoly⁽⁶³⁾のアルカリ抽出法に従った。5ml NB培地で37°C 14時間培養した0.5ml培養液を1.5ml容エッペンドルフチューブに移し、10,000×g、15秒遠心分離する。菌体に100μl溶液1〔2mg/mlリゾチーム-50mMグルコース-10mMシクロヘキサンジアミンテトラ酢酸(CDTA)-25mMトリス塩酸,pH8.0〕を加え、懸濁し、0°C 30分後、200μl溶液2(0.2N NaOH-1% SDS)を加えゆるやかに搅拌する。0°C 5分後150μl溶液3(3M酢酸ナトリウム,pH4.8)を加え、搅拌後、0°C 60分保つ。10,000×g、5分遠心分離し、上澄み液400μlに1000μlのエチルアルコール(-40°C)を加え30分保つ。10,000×g、2分遠心分離し沈殿を100μl溶液4(0.1M酢酸ナトリウム-0.05Mトリス塩酸,pH8.0)にとかす。2倍量のエチルアルコール(-40°C)を加え-40°C 10分後、前述のごとく沈殿を集め20μl TE緩衝液に懸濁する。

区分に 1 ml の HCP-3 または HCP-3 + ade 培地を加え、30°C 1.5 時間保温し、抗生素質耐性の発現を促し、選択培地 (HCP-3 を基本とした抗生素質含有培地) に塗沫後、30°C 4-6 日静置培養した。再生体数は HCP-3 もしくは HCP-3 + ade 寒天培地上で調べた。形質転換頻度は再生体数当りの形質転換体数、再生頻度はプロトプラスト化以前の桿状細胞当りの再生体数として表した。

アガロースゲル電気泳動 ^{x x x x x x x x} アガロースゲル電気泳動は基本的に Sharp らの方法⁽⁶⁴⁾で行った。電気泳動用緩衝液として 40 mM トリス塩酸, pH 7.9 - 1 mM EDTA, pH 7.7 - 5 mM 酢酸ナトリウムを用い、1.4% アガロース (和光純薬工業株式会社、大阪、タイプ II) を含む垂直式スラブゲルを用いた。DNA 試料液 10 µl - 20 µl に色素溶液 (48% サッカロース - 0.15% ブロムフェノールブルー) を 1/6 量加え、アガロースゲル試料口に添加後、7 V/cm の定電圧で 9 時間もしくは 12 V/cm, 4 時間電気泳動した。DNA の染色は最終濃度で 0.5 µg/ml 噻化エチジウムを含む電気泳動用緩衝液にゲルを 30 分浸漬し、続いて 30 分水洗後、Chromato-vue[®] transilluminator model C62 (Ultra-Violet Products, Inc.) 下で調べた。ゲルの写真はコタ ック 2475 レコーディングフィルムを用い、カメラに東芝フィルタ - R2 およびニコンフィルター UV (L37C) を装着して撮影した。

第3節 結 果

1. \times プラスミド形質転換の条件 \times B. subtilis プロトプラストから桿状細胞への再生頻度は、著しくプロトプラスト化条件によって影響された。そこで B. subtilis プロトプラストのプラスミド形質転換と、プロトプラスト化の程度との関係を調べた。B. subtilis YSIIを種々の時間リゾーム処理して得られたプロトプラストに対して pTP4 プラスミドDNAを用いて形質転換を行った(図2-1)。Cm^r形質転換体の数はリゾーム15分処理の後、ほぼ一定の値を示した。一方、形質転換頻度(再生体数当たりの形質転換体)は、リゾーム処理45分まで増加し、最大20%の頻度を示した。B. subtilis YSIIプロトプラストの再生頻度は30分リゾーム処理により 10^{-2} まで減少し、その後ほぼ一定となる。以上の結果は、45分リゾーム処理で得られる球状細胞よりも、プラスミドDNAにより効率よく形質転換されることを示している。

プラスミド pTP4 DNA の濃度をかえて、B. subtilis プロトプラストに対する形質転換頻度を調べたのが図2-2である。30 ng以下のDNA濃度と形質転換頻度とが正比例した。プラスミド pTP4 の分子量が 2.9×10^6 ダルトンであり、図2-2の比例部分から求められる pTP4 DNA 濃度が 30 ng以下の時に得られる Cm^r 形質転換体数の結果より平均 4×10^5 プラスミド分子当たり1個の Cm^r

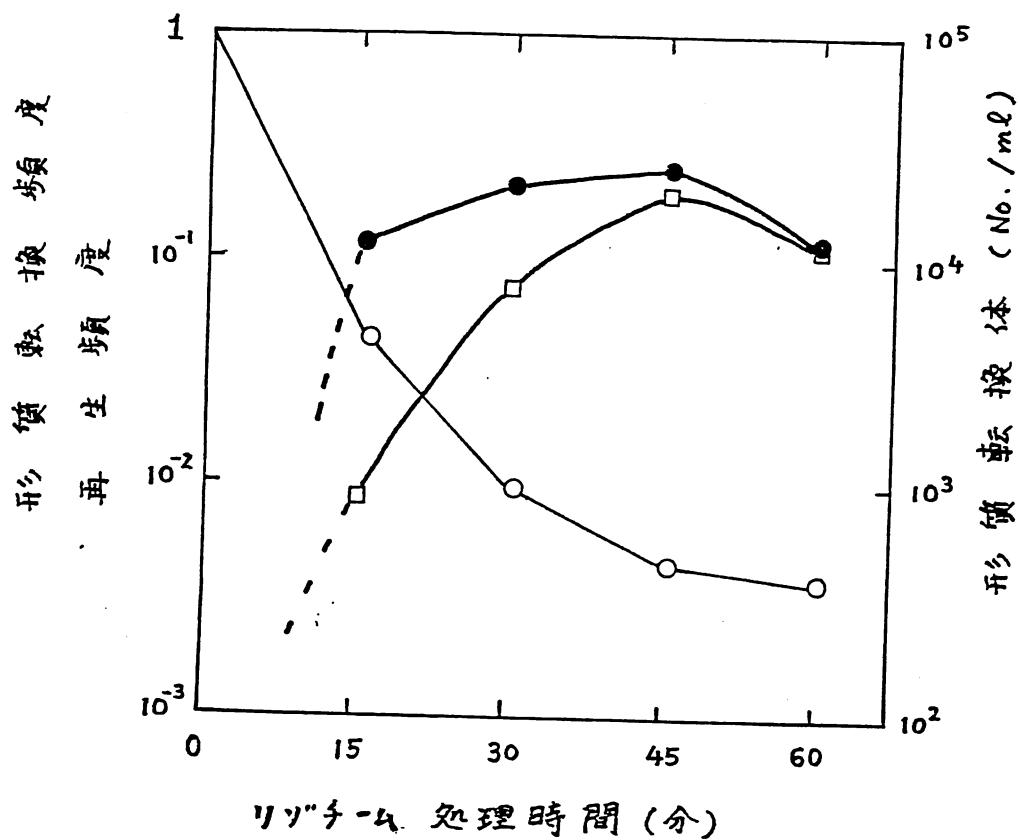


図2-1. プロトコラスト形質転換と再生の時間経過。

B. subtilis YSII の対数増殖期細胞を $250\mu\text{g}/\text{ml}$ リソチム溶液中で 42°C 15, 30, 45 および 60 分保温した。各々から調製した試料は プラスミド pTP4 DNA 溶液(最終濃度 $0.36\mu\text{g}/\text{ml}$)を混合し、40% PEG 溶液を加え、実験材料と実験方法で述べたように処理した。 Cm^r 形質転換体および再生体数は HCP-3+ade+ Cm ($12.5\mu\text{g}/\text{ml}$) と HCP-3+ade 寒天培地上でそれぞれ 30°C 5 日間培養し、出現するコロニー数として数えた。記号: 再生頻度(再生体/全桿菌), ○; Cm^r 形質転換体/ ml , ●; および 形質転換頻度(形質転換体/再生体), ■。

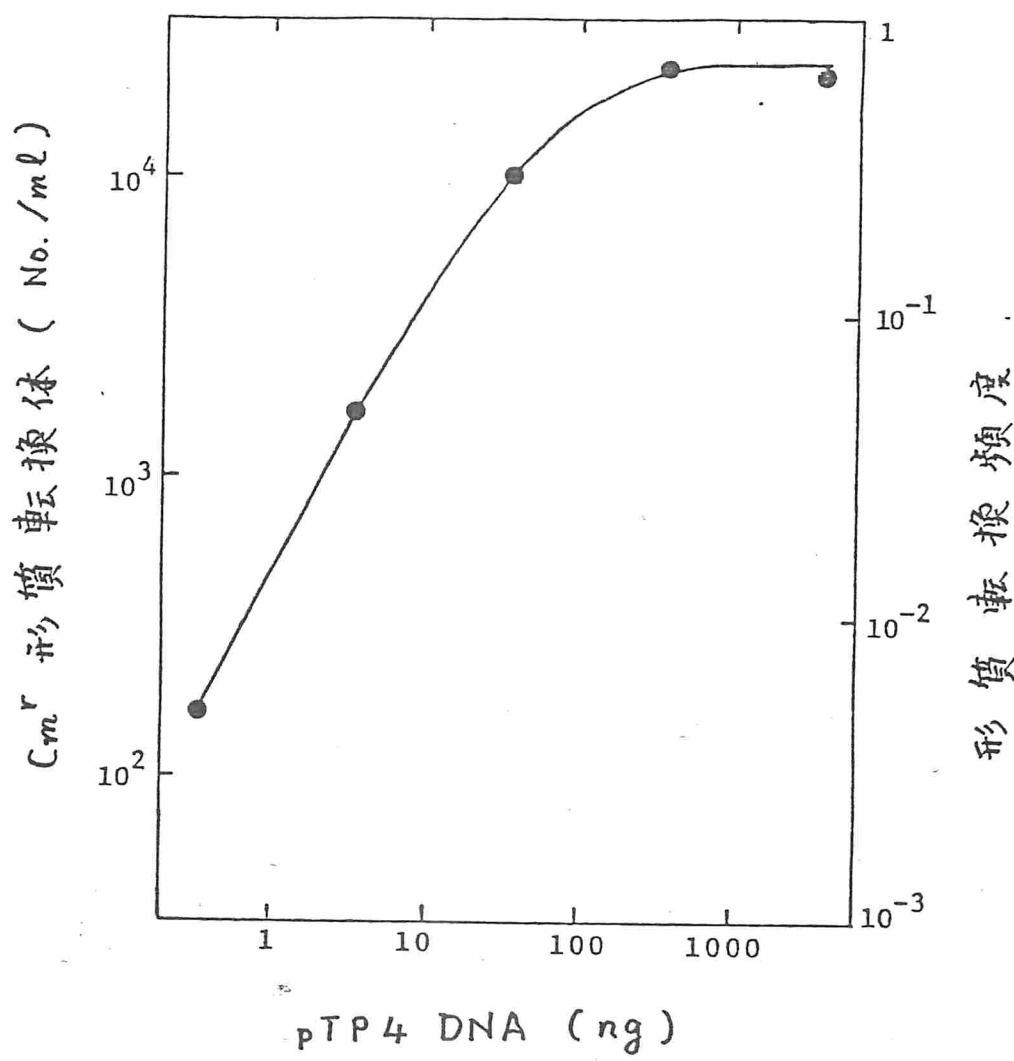


図2-2. B. subtilis YSII の pTP4 DNA による フラスミド形質転換の効率と頻度。形質転換溶液の ml 当りの再生体数は 3.4×10^4 である。フラスミドDNA 溶液 (0.1 ml) と 2×SMM (0.1 ml) との混合液を 1 ml の プロトプラスト懸濁液に加え、続々て 3 ml の PEG 溶液を加え、0°C 2 分後遠心分離し、実験材料と実験方法に述べたように Cm^r 形質転換体数を調べた。

形質転換体が出現することになる。500 ng以上にDNA量が増加した時、再生体の80%がCm^r形質転換体であることを見い出した(図2-2)。

2. 種々のBacillus属におけるプロトプラスミドDNAによるプロトプロラスト形質転換 B. subtilis YS11、B. amyloliquefaciens 23843、B. licheniformis FD0120、B. megaterium IAM1030 および B. pumilus IF012110 の対数増殖期の細胞をリゾチーム処理し、得られたプロトプロラストをHCP-3またはHCP-3+ade寒天培地に塗沫し、30°C 4-5日培養した。その結果、表2-2に示したように Bacillus属の各種プロトプロラストは 1.0×10^{-4} から 6.2×10^{-3} の頻度で再生した。対照のB. subtilis YS11で得られる形質転換効率 (7.1×10^{-1}) ほど高頻度ではないが、調べた4種のBacillusでも 1.3×10^{-2} から 9.2×10^{-2} の頻度でCm^r形質転換体が得られた。これらの結果は、PEGで誘導したプロトプロラスト形質転換法は、Bacillus属一般に有効であることを示している。

B. amyloliquefaciens 23843、B. licheniformis FD0120、B. megaterium IAM1030 および B. pumilus IF012110 のCm^r形質転換体から調製した上清溶菌液のアガロースゲル電気泳動パターンは、B. subtilis LMHA(pTP4)から調製した精製pTP4 DNAと極めて似た電気泳動像を示した(図2-3)。一方、親株はいずれもpTP4のバンドは検出できなかった。以上の結果は、pTP4プラスミドは多くの

表2-2。 プラスミド pTP4 DNA^aによる Bacillus species の PEG で誘導したプロトプラスト形質転換

菌体	生菌数 (No./ml)	再生体数 (No./ml)	形質転換体数 (No./ml)	形質転換 頻度
<u>B. subtilis</u> YSII	1.5×10^7	3.4×10^4	2.4×10^4	7.1×10^{-1}
<u>B. amyloliquefaciens</u> 23843	1.0×10^7	6.2×10^4	8.2×10^2	1.3×10^{-2}
<u>B. licheniformis</u> FD0120	6.2×10^8	6.7×10^4	1.5×10^3	2.2×10^{-2}
<u>B. megaterium</u> IAM1030	2.5×10^7	2.5×10^3	2.3×10^2	9.2×10^{-2}
<u>B. pumilus</u> IF012110	2.3×10^8	6.5×10^4	3.4×10^3	5.2×10^{-2}

a. pTP4 DNA を B. subtilis LMHA (pTP4) 株から調製、精製し、形質転換に使用した。保存溶液のプラスミド pTP4 DNA 濃度は $3.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ でその 0.1ml と $2\times\text{SMM}$ 0.1ml とを加え、 1ml のプロトプラスト溶液と混ぜた。さらに 40% PEG-SMM 3ml を加えた。

Bacillus 属細菌宿主で複製することを示している。

3. B. subtilis と E. coli シャトルベクター一プラスミドによるプロトプラスト形質転換 pTP4 プラスミドを、DNA クローニングベクターとしてより有利に活用するためには、E. coli プラスミド pBR322 と pTP4 プラスミド

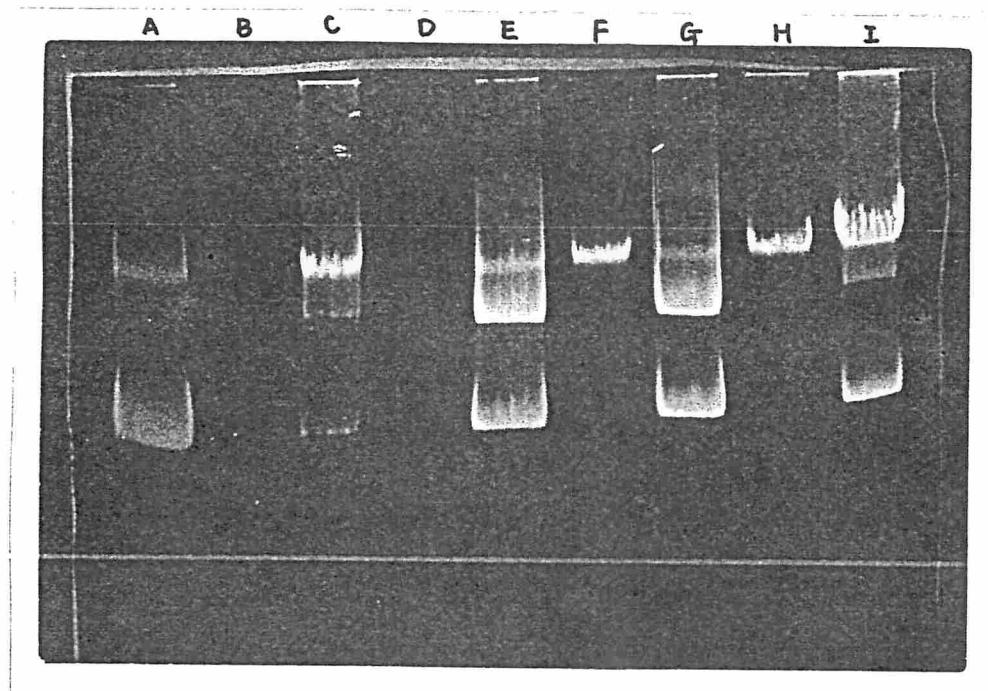


図2-3. Bacillus 属プロトプラストのpTP4 DNAによる形質転換で得られた Cm^r 形質転換体より調製した上清溶菌液の1.4%アガロースゲル電気泳動像。A, B.
subtilis LMHA (pTP4); B, B. licheniformis FD0120; C, B.
licheniformis FD0120 (pTP4); D, B. pumilus IF012110; E,
B. pumilus IF012110 (pTP4); F, B. megaterium IAM1030;
G, B. megaterium IAM1030 (pTP4); H, B. amyloliquefaciens
23843; および I, B. amyloliquefaciens 23843 (pTP4)。

を EcoRI 処理し、T4 DNA リガーゼ処理後、CaCl₂ 処理した E. coli C600 r_Km_K^r コンピメント細胞に加え、Tc^rAp^rCm^r 形質転換体を得た。それら形質転換体から調製、精製した 5.8 メガダルトン (Md) の雜種プラスミドを DNA 供与体とし CaCl₂ 処理した E. coli C600 r_Km_K^r 細胞および B. subtilis MI112 (thr-5, leuB8, arg-15, recE4, r_Mm_M) フロトプラスストを形質転換した。得られた Cm^r 形質転換体より調製した上清溶菌液を調べたところ、E. coli C600 r_Km_K^r の形質転換体では 5.8 Md プラスミドが検出できた。5.8 Md プラスミド中には、pBR322 と pTP4 の挿入方向が互いに異なる 2 種存在する。また E. coli 内で 5.8 Md の雜種プラスミドから 2.9 Md の小プラスミドが生成している例を見い出した。これら結果より、pBR322 と pTP4 との雜種プラスミドは組換え体が生じやすく不安定なプラスミドと考えられる。

それゆえ、E. coli プラスミド (pBR325, pBR322) と S. aureus のプラスミド (pUB110, pC221) から成る pJJK310 (pBR325 + pUB110)、pJJK523 (pBR322 + pC221) を用いて B. subtilis フロトプラススト形質転換を調べた。B. subtilis RM125 (arg-15, leuB8, r_Mm_M^r)、B. subtilis MI112 (thr-5, leuB8, arg-15, r_Mm_M^r, recE4) および B. subtilis 168S (trpC2, strA) フロトプラスストに pJJK310 プラスミド DNA を加え、40% PEG-SMM 溶液を加え、遠心分離で集菌、HCP-3 培地で 30°C 3 時間保温後、HCP-1.5+Km (100 μg/ml 最終濃度) 寒天培地に同培地を重層し 30°C

で培養した（第4章 第2節で述べる高頻度再生法による形質転換法を用いた）。得られた Km^r 形質転換体より上清溶菌液を調製し、アガロースゲル電気泳動でプラスミドDNAを調べた。その結果、図2-4に示したように、5株のRM125の Km^r 形質転換体のうち、1株から得られたプラスミドDNAは、対照の pJKK310 DNAより小さいことを見い出した。また4株のMI112の Km^r 形質転換体はすべて小さな欠失をともなっていた（図2-4）。一方 168S株の Km^r 形質転換体より調べた8株中のプラスミドに欠失は認められなかつた（図2-4）。RM125、MI112および168Sプロトプラストの pJKK523 プラスミドDNAによる形質転換では、 Cm^r 形質転換体は出現したが RM125 および MI112 の Cm^r 形質転換体からはプラスミド pJKK523 は検出できず、168Sからのみ対照の pJKK523 と似たバンドを見い出すことができた（図2-5）。一方、これらプラスミドの欠失または宿主染色体への組込み現象は、E. coli C600 $r\bar{m}m\bar{k}$ (thr, leu, thi, gal, hsdM, hsdR) または E. coli HB101 (pro, leu, thi, lac, endoI, recA, hsdM, hsdR) の形質転換体では見い出しができなかつた。

以上の結果は、B. subtilis の遺伝背景の違いにより pJKK310 の欠失、pJKK523 の宿主染色体への組込みが高頻度で生じること、 $r\bar{m}m\bar{m}$ および recE 遺伝子は上記現象と無関係であること ($r\bar{m}^+m\bar{m}^+$ の菌体でもこの現象が生じることを見い出している および表2-4 参照)、B. subtilis 168S (trpC2, strA) の遺伝背景は上記雑種プラス

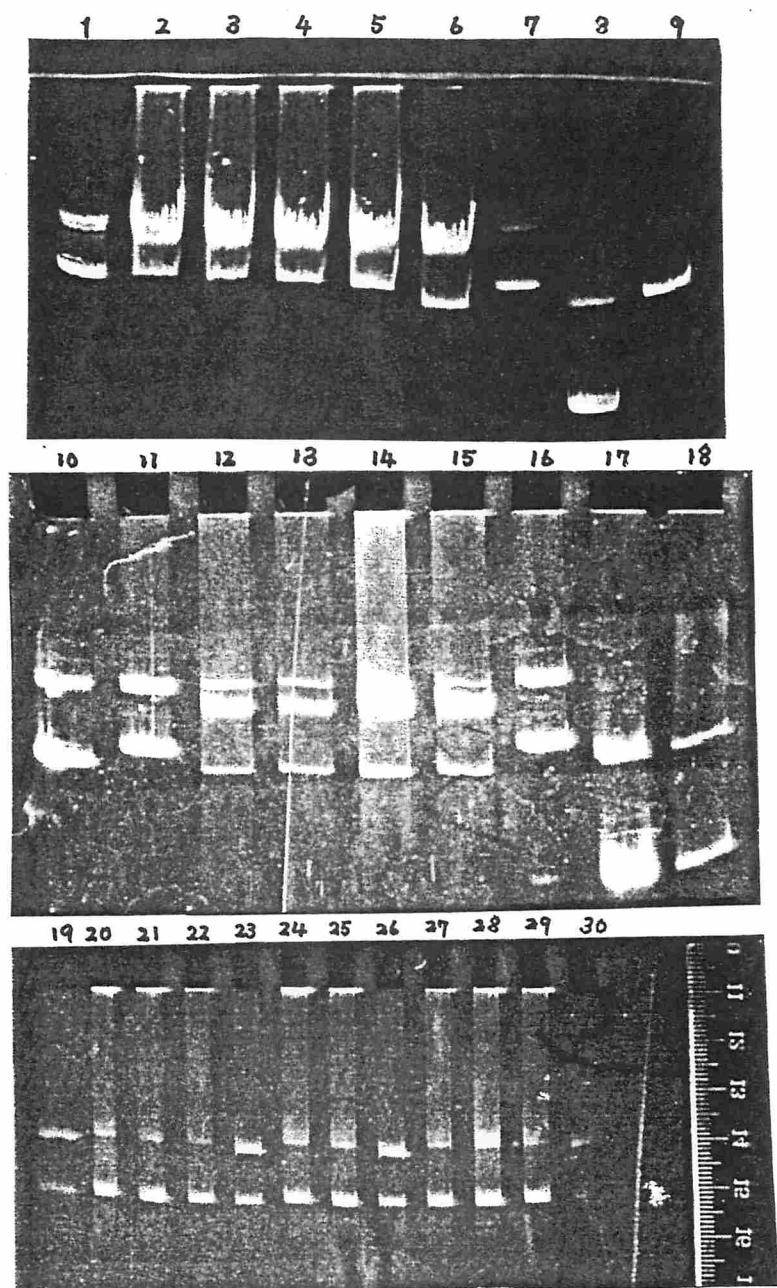


図2-4. pJKK310 DNAによる *B. subtilis* RM125, MII12および168Sの Km^r 形質転換体中で見い出されるプラスミドDNAの1.4%アガロースゲル電気泳動。 1, 7, 11, 16, 19, 23, 26と30, pJKK310 DNA; 2-6, RM125の Km^r 形質転換体よりの上清溶菌液; 8, 17と18, pBR322 DNA; 9と10, pJKK523 DNA; 12-15, MII12の Km^r 形質転換体よりの上清溶菌液; 20-22, 24, 25と27-29, 168Sの Km^r 形質転換体よりの上清溶菌液。

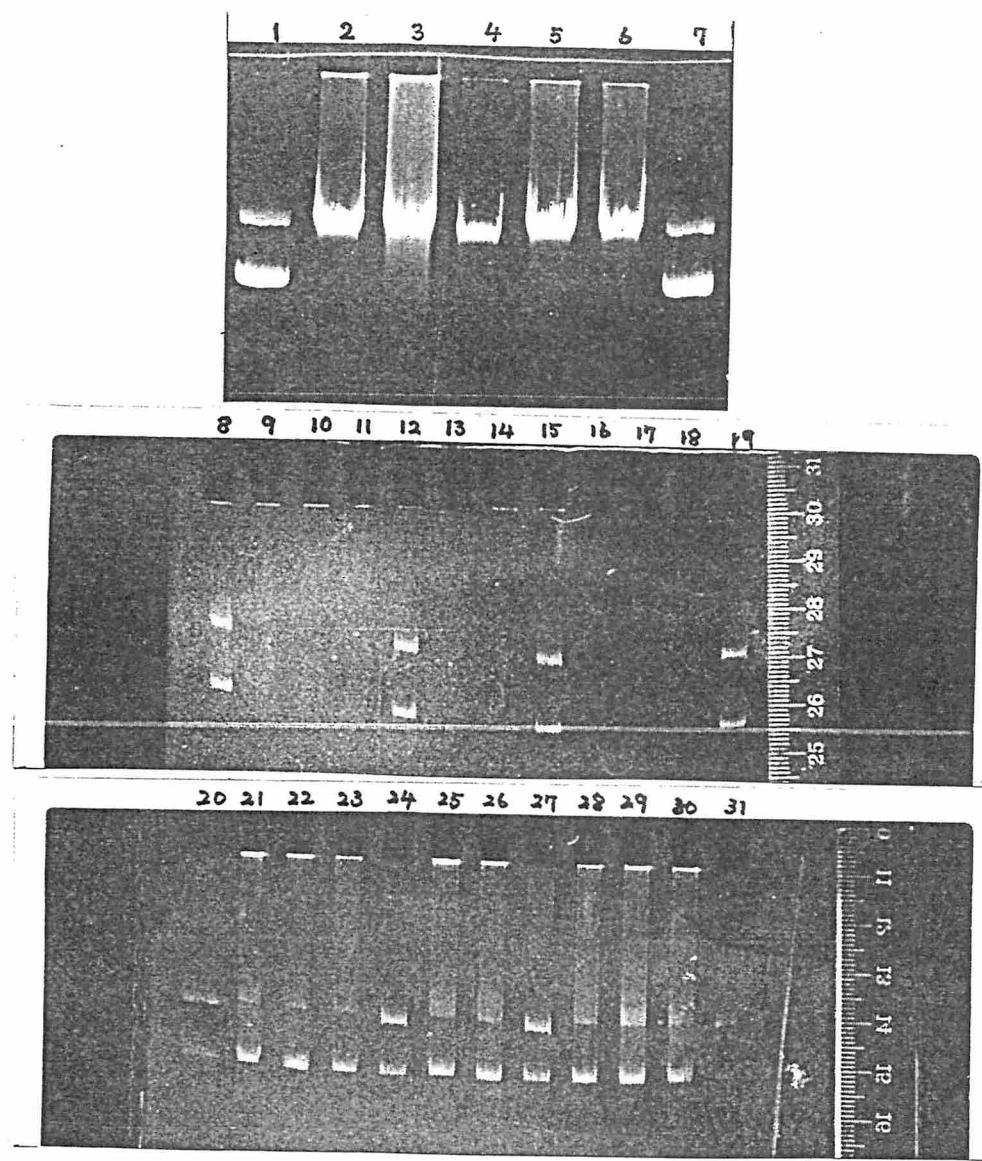


図2-5. pJKK523 プラスミド DNA による B. subtilis RM125, M1112 および 168S の Cm^r 形質転換体より得られる上清溶菌液の 1.4% アガロースゲル電気泳動像。 1, 7, 8, 12, 15, 19, 20, 24, 27 と 31, pJKK523 DNA; 2-6, RM125 の Cm^r 形質転換体より得られる上清溶菌液; 9-11, 13, 14 と 16-18, M1112 の Cm^r 形質転換体より得られる上清溶菌液; 21-23, 25, 26 と 28-30, 168S の Cm^r 形質転換体より得られる上清溶菌液。

ミド (pJKK310 と pJKK523) による形質転換の宿主に適していることを示している。

pJKK310 プラスミドDNAを、B. subtilis プロトプラストに形質転換したときに生じる欠失部分並びにプロトプラスト化の程度と欠失との関係を調べた。種々の B. subtilis 株 (168S, RM125, YSII および LMHA) より、リゾーム処理の時間をかえて調製したプロトプラストを、pJKK310 プラスミドDNAで形質転換し、 Km^r 株を得た。RM125の場合、15分、30分、45分、70分とリゾーム処理の時間が増すにつれて μg DNA 当り形質転換体数は、 2.5×10^2 、 1.8×10^5 、 1.1×10^6 、 5.0×10^6 個と增加了 (表2-3)。菌株により多少異なるが得られた最大形質転換体数は μg DNA 当り $2.8 \times 10^5 - 5.0 \times 10^6$ 個の範囲であった (表2-3)。得られた B. subtilis の Km^r 形質転換体より Doly と Birnboim らの方法⁽⁶³⁾ で上清溶菌液を調製した。それぞれの上清溶菌液のアガロースゲル電気泳動像の解析ならびに上清溶菌液中のプラスミドDNAで E. coli C600 $r_K m_K$ に形質転換した後 Km^r 形質転換体のアンピシリンおよびテトラサイクリン抵抗性を調べて、元の B. subtilis 内での pJKK310 プラスミドの欠失等について調べた。15分リゾーム処理した RM125 の Km^r 形質転換体 5 個よりそれぞれ調製した上清溶菌液のうち 1 個からはすべて $Km^r A_p^r T_c^r$ の E. coli C600 $r_K m_K$ の形質転換体が、残り 4 個からは $Km^r A_p^r T_c^s$ の E. coli C600 $r_K m_K$ の形質転換体が得られた。また後者 4 個の上清溶菌液は電気泳動

表 2-3. B. subtilis プロトプラストの pJKK310
プロラスミド DNA による形質転換頻度

受容菌	リゾーム処理 の時間 (分)	選択 符号	$\frac{Km^r \text{ 形質転換体数}}{\mu\text{g DNA}}$
RM125	15	Km ^r	2.5×10^2
RM125	30	Km ^r	1.8×10^5
RM125	45	Km ^r	1.1×10^6
RM125	70	Km ^r	5.0×10^6
168S	15	Km ^r	7.7×10^2
168S	60	Km ^r	3.3×10^6
YSII	45	Km ^r	2.8×10^5
LMHA	45	Km ^r	4.2×10^5

で調べたところ pJKK310 の欠失プロラスミドを有していた。これらのこととは、15分間リゾーム処理した RM125 プロトプラストは調べた 5 個のうち 4 個は形質転換時あるいはその後にテトラサイクリンを含む領域を欠失したこと示している(表 2-4)。欠失プロラスミドが出現する頻度は、リゾーム処理時間を増したプロトプラストを受容菌とした時 pJKK310 から欠失プロラスミドを生じる頻度は低くなるが(70分処理した RM125 は欠失が検出できない pJKK310 を 28/30 の割合で含む)、15 分リゾーム

表2-4. E. coli C600 rkm^r (pJKK310) より得た pJKK310 DNA による 4 個の B. subtilis 株 (168S、YSII、LMHA、および RM125) と E. coli C600 rkm^r の Km^r 形質転換体ユロニーの解析^a

pJKK310 の由来菌	リゾチーム 処理時間 (分)	選択 符号	<u>E. coli</u> C600 rkm ^r の 形質転換の後に 性格づけされた Km ^r 形質転換体数	Km ^r 形質転換体の表現型 Ap ^r Tc ^r Ap ^r Tc ^s Ap ^r Tc ^r と Ap ^r Tc ^s		
<u>B. subtilis</u>						
RM125	15	Km ^r	5	1	4	0
RM125	70	Km ^r	30	7	2	21
168S	15	Km ^r	24	3	0	21
168S	60	Km ^r	24	11	0	13
YSII	45	Km ^r	4	0	2	2
LMHA	45	Km ^r	8	5	0	3
<u>E. coli</u>						
C600 rkm ^r		Km ^r	10	0	0	0

a. 種々の B. subtilis (pJKK310) および E. coli C600 rkm^r (pJKK310) より調製した上清溶菌液 (pJKK310) による E. coli C600 rkm^r 受容菌の Km^r に対する形質転換を行った。得られた Km^r 形質転換体 (50-100 個) の Ap、Tc 抵抗性を調べた。

b. E. coli C600 rkm^r の Km^r 形質転換体 (50-100 個) がすべて Ap^rTc^r、Ap^rTc^s を示した以外に Ap^rTc^r クローンヒ Ap^rTc^s クローンから成る場合も認められた。

処理した $168S$ のプロトプラストでは、すべて元の pJKK310 を含むので、欠失が生じるかどうかは主として菌株の遺伝背景によると考えられる（表2-4）。

4. B. subtilis における挿入不活性ベクターの作製

B. subtilisにおいて E. coli プラスミド遺伝子 amp は発現しないことが知られている。E. coli プラスミド遺伝子 tet の B. subtilis $168S$ における発現は、宿主 B. subtilis $168S$ 株がテトラサイクリン耐性であるので調べることができない。[B. subtilis $168S$ と B. subtilis $168S$ (pJKK310) は、ともにテトラサイクリン $5\mu g/ml$ および $10\mu g/ml$ を含む NA 培地上で増殖し、 $15\mu g/ml$ および $20\mu g/ml$ 濃度の NA 培地上では増殖できない]。それゆえ、B. subtilis $168S$ (trpC2, strA) より NTG 突然変異処理し、 $1\mu g/ml$ のテトラサイクリンを含む NA 培地でも増殖できない Tc^S 突然変異体 15 個を分離した。これらの Tc^S 突然変異体よりプロトプラストを調製し pJKK310 プラスミド DNA により形質転換を行い、 Km^r 形質転換体を得た。すべての Km^r 形質転換体は $1\mu g/ml$ のテトラサイクリンを含む NA 培地で増殖が認められなかった。 Km^r 形質転換体より調製した上清溶菌液のアガロースゲル電気泳動像より対照の pJKK310 DNA と極めて似ており、かつ上記溶菌液中のプラスミド DNA による E. coli C600 $r_k m_k^-$ の Km^r 形質転換体は $Ap^r Tc^r$ を示した。以上の結果は pJKK310 プラスミドのもつ pBR325 に由来する tet 遺伝子は、

B. subtilis 内で発現しないことを示している。

上記 pJKK310 プラスミドを保有する Tc^S 突然変異体の 1 株、B. subtilis AC28 (trpC2、strA、tet-1) より 2 株の Tc^r 自然突然変異体および 2 株の NTG 処理による Tc^r 突然変異体を分離した。それら Tc^r 突然変異体より上清溶菌液を調製し、E. coli C600 $r\bar{K} m\bar{K}$ および B. subtilis AC28 の Km^r 形質転換体を選んだ。それら Km^r 形質転換体の Tc 抵抗性を調べたところ、自然突然変異体 2 個より調製した上清溶菌液の 1 個および NTG 処理して得た突然変異体 2 個より調製した上清溶菌液の 1 個からそれぞれ $Km^r Tc^r$ の形質転換体が出現した。すなわち、4 個の Tc^r 突然変異体のうち、2 個は B. subtilis AC28 の宿主突然変異で残り 2 個は pJKK310 プラスミド突然変異であることを示している。 $Km^r Tc^r$ 形質転換体より上清溶菌液を調製し、アガロースゲル電気泳動で調べたところ図 2-7 に示したように pJKK310 より分子量の小さなプラスミドを見出した。これらプラスミドを pAC1 および pAC2 と名づけた。

pAC1 および pAC2 の分子量ならびに欠失領域を調べるために、BamHI、EcoRI、HindIII 制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動で DNA の切断点を調べた。pAC1 は図 2-8 に示すように HindIII、EcoRI および BamHI で 1ヶ所切断される。さらに E. coli 内で pAC1 は Ap^r 、 Tc^r および Km^r を示すことより欠失領域は、HindIII 部位から pUB110 と pBR325 の結合部の EcoRI 部位に

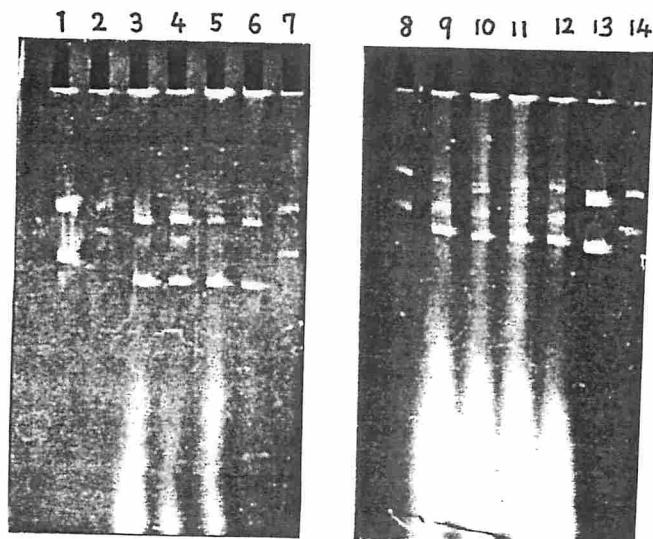


図 2-7. pAC1 および pAC2 プラスミド DNA の 1.4% アガロースゲル電気泳動。1-13, pJKK523 DNA; 2, 7, 8 と 14, pJKK310 DNA; 3-6, B. subtilis AC28 (pAC1) よりの pAC1 DNA; 9-12, B. subtilis AC28 (pAC2) よりの pAC2 DNA。

pUB110 領域の BamH1 を含む約 2.3 kb と考えられる。一方、pAC2 では EcoR1, HindIII で 1ヶ所、BamH1 で 2ヶ所切斷されること、また E. coli 内で Ap^r , Tc^r , Km^r を示すことにより欠失領域は HindIII と BglII の間の EcoR1 を含む領域約 1.0 kb であると考えられる（図 2-9）。

pAC1 および pAC2 プラスミド DNA を B. megaterium FM4 種 (ilv-1, arg-1) にプロトプラスト形質転換して Km^r 形質転換体が得られた（図 2-10）。このように

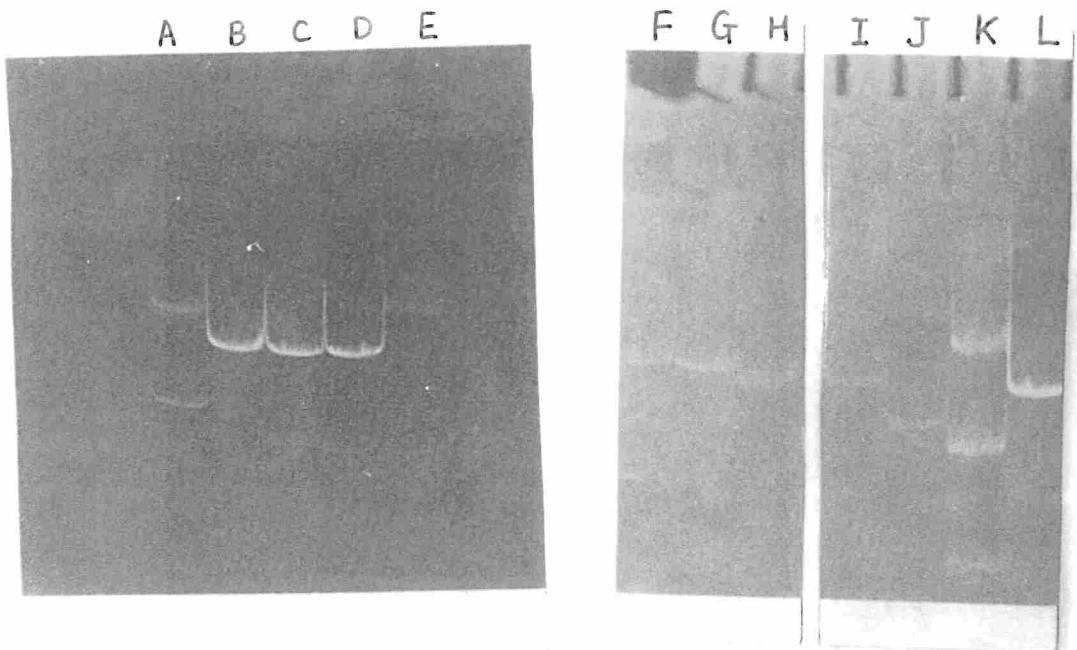


図2-8。 pAC1 および pAC2 プラスミドの制限酵素切
断パターンの解析。 A, E および K, pAC1; B-D,
および L, pAC1; B, BamH I 处理、 C, EcoR I 处理、
D および L, Hind III 处理; J, pAC2; F-I, pAC2;
F, Hind III 处理、 G, EcoR I 处理; H および I, BamH I
処理。

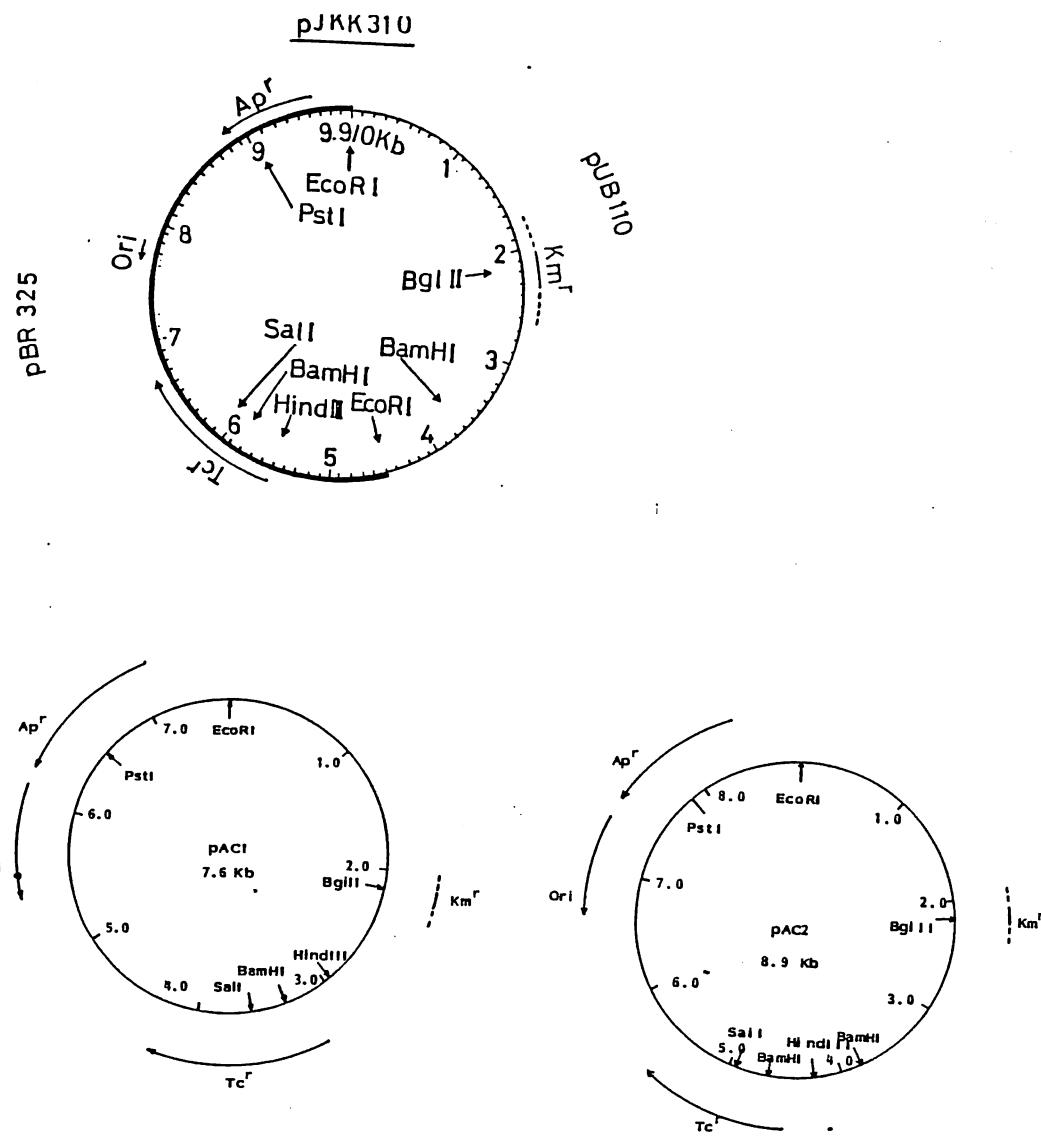


図2-9. pJKK310, pAC1 および pAC2 の制限地図。

pJKK310 の制限酵素地図は太円で表わした pBR325⁽⁵⁸⁾ と細円で表わした pUB110⁽⁵⁹⁾ の制限酵素地図をあわせた地図である。円外の Ori 記号は E. coli pBR325 フラスミドの複製起点である。

pAC1 および pAC2 は、E. coli、B. subtilis および B. megaterium のシャトルベクターであることに加え、Tc (Hind III、Sal I, Bam HI)、Ap (Pst I)、および Km (Bgl II) 遺伝子の挿入不活性化標識として使用できるので有用なベクターである。

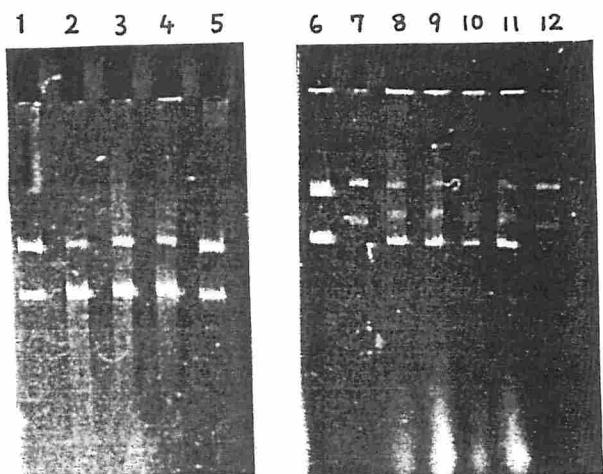


図 2-10。 プラスミド DNA の 1.4% アガロース電気泳動。
1 と 5, B. subtilis AC28 より調製した pAC1; 2-4,
B. megaterium FM4 より調製した pAC1; 6, pJKK523;
7 と 12, pJKK310; 8, B. subtilis AC28 より調製した
pAC2; 9-11, B. megaterium FM4 より調製した pAC2。

第4節 考察

Staphylococcus aureus から見い出された pC194⁽⁴⁴⁾、
pUB110 プラスミド⁽⁶⁹⁾ 並びに Bacillus cereus からの
pBC16 プラスミド⁽⁷⁰⁾ が Bacillus 属のクローニングベクターとしてしばしば用いられている。プラスミドによる B. subtilis のプロトプラスト形質転換の他、B. thuringiensis や B. megaterium のプロトプラストが pC194 と pBC16、
pUB110、pBC16 その他のプラスミドによって形質転換されている。⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ 一方、クロラムフェニコール耐性の遺伝子を含む Staphylococcus プラスミド pTP4 は分子量が 2.9×10^6 ダルトンと小さく、B. subtilis 内で安定に維持される。それゆえ、pTP4 DNA が他の Bacillus 属細菌で維持されるかどうかを調べた。本研究において、B. subtilis、B. amyloliquefaciens、B. licheniformis、B. megaterium および B. pumilus では プラスミド pTP4 DNA をプロトプラスト形質転換して Cm 耐性形質転換体が得られた。これら形質転換体からの上清溶菌液の電気泳動像は、B. subtilis LMHA (pTP4) のパターンと極めて似ていた。すなまち、pTP4 プラスミドは Staphylococcus aureus と B. subtilis のみならず調べた4種の Bacillus 内で複製、維持され、Cm 耐性遺伝子が発現される。このように、pTP4 は種々の Bacillus 属細菌のベクターとして使用でき、プロトプラスト形質転換法はプラスミド形質転換の有効な手法

であると考えられる。

pBR322 と pC221 から成る $\text{Ap}^r \text{Tc}^r \text{Cm}^r$ プラスミド (pJJK523) ⁽⁵³⁾ と pBR325 と pUB110 から成る $\text{Ap}^r \text{Tc}^r \text{Km}^r$ プラスミド (pJJK310) ⁽⁵³⁾ による B. subtilis Jプロトプラスの形質転換を調べたとき、pJJK523 は B. subtilis 168S (trpC2, strA)においてのみ安定に維持、複製されたが、B. subtilis RM125 (arg-15, leuB8, r_M m_M) および B. subtilis MI112 (thr-5, arg-15, leuB8, recE4, r_M m_M) では Cm^r 形質転換体は得られたが細菌中にプラスミドを検出できなかつた。すなわち、pJJK523 プラスミドの recE4 ⁽⁷¹⁾ に依存しない宿主染色体への組込みが ^(52, 72) B. subtilis で生じたことを示すものである。形質転換において、pJJK310 プラスミドの一部欠損が生じた。この欠損プラスミドの出現頻度は B. subtilis をリゾチーム処理した時間により従つて細胞壁の除去程度の差によって影響を受けるが、宿主の遺伝背景にも大いに依存している (表2-4)。

pJJK310 は、E. coli C600 $\text{r}^{\text{K}} \text{m}^{\text{K}}$ 内で $\text{Ap}^r \text{Tc}^r \text{Km}^r$ の表現型を与える。B. subtilis AC28 の pJJK310 DNA による Km^r 形質転換体は Tc 感受性を示す。今回の実験で得た結論と Kreft らの結論 ⁽⁵³⁾との間で矛盾しない解釈のうち菌株の違ひにより tet 遺伝子の読み取りが異なるとは考えにくく。なぜならば同じ B. subtilis において RNA ポリメラーゼの認識が大いに異なると考えることは困難である。第2に、Kreft らが実験に用いた pJJK310 とは異なり今回用いた pJJK310 は、ある点突然変異のような突然

変異を持ちそれゆえ、B. subtilis 内で発現しなくなったと考えられる。しかしながら、その仮想の突然変異は、E. coli 内での発現には影響しないという条件が必須である。第3番目の解釈は、Kreftらが扱った $Km^r Tc^r$ 形質転換体は、B. subtilis 168S プロトプラストの pJJK310 DNA による形質転換で観察したような pJJK310 と欠失 pJJK310 の混合から成る菌株であり、かつ欠失 pJJK310 は pAC1 や pAC2 のようなタイプであるとへう考え方である。B. subtilis BR151 プロトプラストの Km^r 形質転換体を得る際、しばしば Kreftらが欠失突然変異をともなったプラスマトイドを観察している事実より上の考え方が正しいとするならば、te₁ 遺伝子が B. subtilis 内で発現するといふ誤った結論が引き出されるであろう。

第5節 索 約

ポリエチレングリコール (PEG) で誘導したプロトプラストの pTP4 DNA による形質転換が Bacillus subtilis、B. amyloliquefaciens、B. licheniformis、B. megaterium および B. pumilus に対し有用であることを認めた。上記 Bacillus 属の細菌のプラスマトイド pTP4 による Cm^r 形質転換体は元の pTP4 DNA と極めて似たプラスマトイドを保有していた。pTP4 DNA は Bacillus 属の広範囲にわたって複製維持され、その Cm 耐性遺伝子が発現されるので、クローニン

ゲベクター プラスミドとして有用である。挿入不活性ベクターとして pJJKK310 の欠失突然変異より pAC1 および pAC2 プラスミドを分離した。両プラスミドは、*B.* *subtilis* においてテトラサイクリンおよびカナマイシン耐性を示し、*B. subtilis* および *B. megaterium* のシャトルベクターである点で有用である。

第3章 プロトプラスト融合

第1節 緒言

細菌のポリエチレングリコールで誘導したプロトプラスト融合が、1976年 Schaeffer & Hotchkiss⁽²⁾ 並びに Fodor & Alfordi⁽³⁾ によってそれぞれ Bacillus subtilis および B. megaterium で報告されて以来、Streptomyces、Brevibacterium、Providence alcalifaciens⁽⁴⁾、staphylococci⁽⁵⁾ 等で報告された。細胞融合法は遺伝交換系が知られていない系でも可能であり、遺伝子地図の作製、異種間または同種内で組換え体の取得など重要な意味を持っている。B. subtilis プロトプラストの再生培地は、B. megaterium のそれと異なりゼラチン、馬血清または牛血清アルブミンなど複雑な物質を含んでいるため、従来法では融合体を直接選択することができず、全再生体中から融合体を選び出していた。この繁雑を克服するため、第1章で見出したHCPならびに HC*P 寒天培地を用いて Bacillus 属の同種間および異種間細胞融合体を直接選択する方法を確立した。またここで確立した方法を用いた B. megaterium の 2 遺伝子間の連関を調べ、B. subtilis 染色体地図と簡単に比較した。

第2節 実験材料と実験方法

菌株およびプラスミド 使用した菌株を表3-1に示す。突然変異体はすべて第1章 第2節で述べたNTG突然変異処理により分離した。B. subtilis 168SA株からB. subtilis YSII DNA (purB6、arg-15、leuB8) により μg DNA 当り 10^4 個の Ade⁺ 形質転換体が得られるが、一方 B. subtilis LMHA (purA16、leuA8、metB5、hisA3) DNA では μg DNA 当り <10個の Ade⁺ 形質転換体しか得られない。さらに PBSI フージ形質導入により cysA14 と連鎖していた。それゆえ、B. subtilis 168SA株のアデニン要求性は purA により生じたものと結論した。Cm 耐性プラスミド pTP4 を含む B. subtilis LMHA (pTP4) は Bacillus 属細菌との異種間細胞融合に使用した。

培地 第1章 第2節で述べたNB 培地を栄養細胞の増殖のために使用した。プロトプラストの生育および再生培地には浸透圧調整した HCP-3 寒天培地ならびに培地 1l 当り 5g カゼミノ酸の代わりに 20mg カゼミノ酸、1g クエン酸ナトリウム、2g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む以外 HCP-3 寒天培地と同組成の HC^{*}P-3 寒天培地を使用した。前者培地は、またプロトプラスト融合における核酸塩基を指標として細胞融合体を選択する時、後者培地 (HCP-3 寒天培地) はアミノ酸を指標として直接細胞融合体を選択する際に使用した。

表 3-1。 菌株リスト

菌株	遺伝子型	起源および由来
<u>B. subtilis</u>		
168S	<u>trpC2</u> 、 <u>strA</u>	第1章
168SA	<u>trpC2</u> 、 <u>strA</u> 、 <u>purA</u>	168Sの <u>purA</u> 変異体
I-18	<u>hisH2</u>	* a (18)
YS 11	<u>purB6</u> 、 <u>arg-15</u> 、 <u>leuB8</u>	第1章
LMHA	<u>purA16</u> 、 <u>leuA8</u> 、 <u>metB5</u> 、 <u>hisA3</u>	第1章
LMHA (pTP4)	<u>purA16</u> 、 <u>leuA8</u> 、 <u>metB5</u> 、 <u>hisA3</u> 、 <u>Cm^r</u>	第2章、河野惠教授
<u>B. amyloliquefaciens</u>		
F	<u>arg</u> 、 <u>his</u>	* (18)
<u>B. licheniformis</u>		
ATCC 9945 A	<u>wild-type</u>	* (18)
I2107T	<u>thr</u>	ATCC 9945 A の <u>thr</u> 変異体
FD0120	<u>met-1</u> 、 <u>pepA1</u>	* 第2章
FD0250	<u>his-6</u> 、 <u>pepA1</u>	* (18)
HM	<u>his-6</u> 、 <u>pepA1</u> 、 <u>met</u>	FD0250よりの <u>met</u> 変異体
<u>B. megaterium</u>		
IAM1030	<u>wild-type</u>	* 第2章
FM4	<u>ilv-1</u> 、 <u>arg-1</u>	IAM1030よりの <u>ilv</u> <u>arg</u> 変異体
FM27	<u>gly-1</u>	IAM1030よりの <u>gly</u> 変異体
FM7	<u>met-1</u> 、 <u>trp-1</u>	IAM1030よりの <u>met</u> <u>trp</u> 変異体
FM9	<u>ilv-2</u> 、 <u>thr-1</u>	IAM1030よりの <u>ilv</u> <u>thr</u> 変異体
A	<u>arg-2</u>	IAM1030よりの <u>arg</u> 変異体
FMS2-1	<u>met-1</u>	FM7 × FM27 細胞融合組換え体
FMS2-9	<u>trp-1</u>	FM7 × FM27 細胞融合組換え体
<u>B. pumilus</u>		
IFO12110	<u>wild-type</u>	* 第2章

a. 関 達治博士より分譲

プロトプラスト融合
合法は Schaeffer らの方法⁽²⁾ に準じた。すなわち、第 1 章
第 2 節 で述べたようにし、プロトプラストを調製した。
2 種の Bacillus 属菌株のプロトプラスト懸濁液を混ぜ
 $4,000 \times g$ 、10 分間遠心分離し 0.2 ml のサッカロース-マレ
イン酸緩衝液 (SMM) に懸濁した。1.8 ml のポリエチレ
ングリコール溶液 [100 ml の SMM 中に 40 g のポリエチ
レングリコール (PEG 4000、和光純薬工業株式会社、平
均分子量 3,000) を含む溶液] を加え、0°C 1 分間保つ
た後、適当に希釀し、再生培地に塗沫し、30°C 4-6 日間
静置培養した。細胞融合体は 2 個の栄養要求性遺伝子を
指標に選択するかまたは Cm^r プラスミド pTP4 を有する
 Ade^+ クローンとして、選択した。細胞融合頻度は片親の
再生体で、数の少ない方の再生体数 (minority parent)
に対する細胞融合組換え体もしくは $Ade^+ Cm^r$ クローンの
割合として表わした。また加えた菌体数 (全生菌数) に
に対する細胞融合体数は、細胞融合頻度の別の指標として
使用した。

第 3 節 結 果

1. プロトプラスト融合の条件検討 得られる細胞
融合体の頻度とリソチーム処理時間の関係を B. subtilis
YSII (purB6, leuB8, arg-15) と B. subtilis LMHA (purA16,

leuA8、metB5、hisA3) 間の Ade⁺ 細胞融合体数より調べた。リゾチーム溶液中 15 分間処理した後、浸透圧耐性細胞数は全細胞当たり 10^{-5} 以下となり、生じたプロトプラストは両菌株とも 20-30 % の再生頻度を示した。しかし、低い細胞融合体の出現頻度 (4.6×10^{-5}) しか得られなかつた。30 分リゾチーム処理プロトプラストを用いると、Ade⁺ 細胞融合頻度は 1 % まで増加し、45 分および 60 分処理で最高頻度 (9 %) が得られた。これらの結果から、以下の実験には 45 分リゾチーム処理したプロトプラストを細胞融合に使用した。

2. Bacillus 属細菌における同種間細胞融合 B. licheniformis および B. subtilis の各々 3 株を用い、HC*P-3 寒天培地上でアミノ酸または核酸塩基を指標にし、直接細胞融合体を選択して得られた同種間細胞融合の結果を示したのが表 3-2 である。異なる選択符号にもかかわらず組換え体が高頻度 ($4.5 \times 10^3 - 9.9 \times 10^{-2}$) に得られた。このことは、ポリエチレングリコール誘導プロトプラスト融合を行った後融合体を直接選択する方法が Bacillus 属において安定な組換え体を分離する有効な方法であることを示唆している。

B. subtilis 1-18 (hisH2) と B. subtilis 168SA (purA、strA、trpC2) との交雑で得られた Ade⁺ His⁺ 細胞融合体 358 個の非選択符号 (strA および trpC2) について調べた。その結果、320 個、6 個、31 個および 1 個の

表 3-2. B. subtilis および B. licheniformis^a における同種間細胞融合

菌株 (交雫)	選択 符号	再生頻度	融合頻度 ^b	
			細胞融合体	初発菌体 最少の再生体
<u>B. licheniformis</u>				
12107T <u>thr</u>		2.2×10^{-3}		
FDO120 <u>met-l, pepA1</u>		9.9×10^{-4}		
FDO250 <u>his-b, pepA1</u>		1.8×10^{-3}		
(12107T × FDO120)	<u>Thr⁺ Met⁺</u>		2.5×10^{-5}	9.9×10^{-2}
(FDO120 × FDO250)	<u>Met⁺ His⁺</u>		6.6×10^{-6}	1.1×10^{-2}
(12107T × FDO250)	<u>Thr⁺ His⁺</u>		8.8×10^{-6}	2.9×10^{-2}
<u>B. subtilis</u>				
I-18 <u>hisH2</u>		2.5×10^{-2}		
168S <u>trpC2, strA</u>		3.4×10^{-2}		
168SA <u>trpC2, strA, purA</u>		1.8×10^{-3}		
(I-18 × 168S)	<u>His⁺ Trp⁺</u>		2.4×10^{-5}	4.5×10^{-3}
(I-18 × 168SA)	<u>His⁺ Ade⁺</u>		1.1×10^{-5}	1.2×10^{-2}

a. 掛け合わせ二菌株のプロトプラスト混合懸濁液を 0°C、1分ポリエテレングリコール処理し、その懸濁液を希釈し、HCP-3 寒天培地上にまたは L-トリプトファンを欠く HCP-3 寒天培地上に塗沫した。アミノ酸あるいは核酸塩基符号により直接選択した細胞融合体の数は 30°C 5-6 日後に計数した。

b. 細胞融合頻度は Gabor と Hotchkiss によって述べられた初発菌体数(両菌体の生菌数の合計)に基づいて表わした。さらにポリエテレングリコール処理しない親株の HCP-3 または HCP-3 + ade 寒天培地上での再生体数の少ない数(最少の再生体)に基づいて表わした。

クローンが $\text{Trp}^- \text{Str}^S$ 、 $\text{Trp}^+ \text{Str}^S$ 、 $\text{Trp}^- \text{Str}^R$ および $\text{Trp}^+ \text{Str}^R$ の表現型をそれぞれ示した。trpC および hisH 遺伝子間の組換え頻度 ($\text{Trp}^+ / (\text{Trp}^+ + \text{Trp}^-)$) が約 2 % と低いことはすでに形質転換法によって認められ報告されている⁽⁷³⁾ trpC と hisH 間の強い連鎖を意味する。また purA と strA 間の組換え頻度 ($\text{Str}^R / (\text{Str}^R + \text{Str}^S)$) が約 9 % と低いことも purA と strA 遺伝子間の連鎖でも細胞融合法により検出できるこことを示している。すなわち、形質転換で検出できる強い連鎖のみならず、PBSI フージで検出できるような弱い連鎖さえプロトプラスト融合法で検出できる。

B. megaterium IAM1030 (wild-type) より NTG 突然変異処理をし、アミノ酸要求性突然変異体を得た。それら突然変異体よりプロトプラストを調製し、細胞融合した後、両親株のアミノ酸要求性が回復した融合体を選択した。得られた融合体の非選択符号の分離を調べたところ、表 3-3 に示すような結果が得られた。FM4 (ilv-1, arg-1) と FM27 (gly-1) の掛け合せより得られた $\text{Gly}^+ \text{Arg}^+$ 融合体 172 個のうち 164 個が Ilv^+ で 8 個が Ilv^- であった。すなわち ilv-1 と arg-1 間の組換え体 (Ilv^-) の出現頻度 ($8/172$) は低い。一方 125 個の $\text{Gly}^+ \text{Ilv}^+$ 融合体のうち、110 個が Arg^+ で 15 個が Arg^- となり、ilv-1 と arg-1 遺伝子間の組換え体 Arg^- の出現頻度 ($15/110$) が低い。以上の結果は、染色体上で ilv-1 遺伝子と arg-1 遺伝子が連鎖していることを示す。同様に ilv-2 と thr-1 および gly-1 と trp-1 間でも連鎖を認めた。

表 3-3。 B. megaterium 同種内細胞融合による ilv-1 & arg-1、
ilv-2 & thr-1、および w^r gly-1 & trp-1 の連関関係

掛け合わせ親株 (遺伝子型)	選択符号	組換え体	
		クラス	数
FM4 (<u>ilv-1</u> , <u>arg-1</u>)	Gly ⁺ Arg ⁺	Ilv ⁺	164
		Ilv ⁻	8
		計	172
	Gly ⁺ Ilv ⁺	Arg ⁺	110
		Arg ⁻	15
		計	125
FM4 (<u>ilv-1</u> , <u>arg-1</u>)	Met ⁺ Ilv ⁺	Arg ⁺	45
		Arg ⁻	2
		計	47
	Met ⁺ Arg ⁻	Ilv ⁺	170
		Ilv ⁻	1
		計	171
FM4 (<u>ilv-1</u> , <u>arg-1</u>)	Trp ⁺ Ilv ⁺	Arg ⁺	89
		Arg ⁻	4
		計	93
	Trp ⁺ Arg ⁺	Ilv ⁺	158
		Ilv ⁻	2
		計	160
FM7 (<u>met-1</u> , <u>trp-1</u>)	Gly ⁺ Met ⁺	Trp ⁺	4
		Trp ⁻	38
		計	42
	Gly ⁺ Trp ⁺	Met ⁺	252
		Met ⁻	75
		計	327
FM9 (<u>ilv-2</u> , <u>thr-1</u>)	Met ⁺ Thr ⁺	Ilv ⁺	45
		Ilv ⁻	11
		計	56
	Met ⁺ Ilv ⁺	Thr ⁺	40
		Thr ⁻	3
		計	43
FM9 (<u>ilv-2</u> , <u>thr-1</u>)	Trp ⁺ Ilv ⁺	Thr ⁺	37
		Thr ⁻	2
		計	39

3. 異種間細胞融合によるプロラスマミドの移入 B.
subtilis LMHA (pTP4) と Bacillus 属 (B. amyloliquefaciens
F, B. licheniformis FD0120, B. megaterium IAM1030 および
B. pumilus IF012110) との間の異種間細胞融合を調べた。
ポリエチレングリコール処理後、掛け合わせた 1 対のプロ
ロトプロラスト懸濁液をそれぞれ B. subtilis LMHA (pTP4)
の増殖できな HCP-3 寒天培地に塗沫した。30°C 4 日後
に生じた再生体をクロラムフェニコールを含んだ NA 培地
に移し、 $Ade^+ Cm^r$ 細胞融合体の出現頻度を調べた。その
結果、掛け合わせの組によって異なるが、いずれの場合
にも 5.0×10^{-1} から 4.4×10^{-4} の頻度で $Ade^+ Cm^r$ 細胞融合
体が得られた (表 3-4)。 $Ade^+ Cm^r$ 融合体の大部分 (80%
以上) は、B. subtilis LMHA (pTP4) から移入された
 Cm^r プラスマミドを持つクローンから成っていた。

B. amyloliquefaciens F、または B. licheniformis FD0120
と B. subtilis LMHA (pTP4) との間の交雑で得られた
 $Ade^+ Cm^r$ 融合体で、かつ B. amyloliquefaciens または B.
licheniformis の栄養要求性を示すものから上清溶菌液を
調製し、プロラスマミドのアガロースゲル電気泳動像を調べ
た (図 3-1)。細胞融合体は、両方とも B. subtilis LMHA
(pTP4) より精製した標準 pTP4 のバンドと極めて似た
閉鎖環状および開環状のバンドを示した。一方親株中に
はそれらは認められなかった (図 3-1, B, D)。

以上の結果から、 $Ade^+ Cm^r$ 細胞融合体は B.
amyloliquefaciens または B. licheniformis へプロラスマミド

表 3-4。 *Bacillus* 属における異種間細胞融合^a

菌株 [交雫]	生菌数 ml	再生頻度	融合頻度 ^b	
			Ade ⁺ Cm ^r 細胞融合体	初発菌体 最少再生体
1. <i>B. amyloliquefaciens</i> F	1.7×10^8	1.2×10^{-3}		
2. <i>B. subtilis</i> LMHA(pTP4)	8.5×10^8	6.9×10^{-3}		
[1 × 2]			4.5×10^{-7}	2.3×10^{-3}
3. <i>B. licheniformis</i> FD0120	8.8×10^8	1.1×10^{-3}		
4. <i>B. subtilis</i> LMHA(pTP4)	3.3×10^8	6.1×10^{-3}		
[3 × 4]			1.5×10^{-5}	1.9×10^{-2}
5. <i>B. licheniformis</i> FD0250	8.1×10^8	1.6×10^{-3}		
6. <i>B. subtilis</i> LMHA(pTP4)	2.3×10^8	3.2×10^{-3}		
[5 × 6]			2.6×10^{-5}	3.8×10^{-2}
7. <i>B. megaterium</i> A	2.2×10^7	2.6×10^{-5}		
8. <i>B. subtilis</i> LMHA(pTP4)	2.5×10^8	4.5×10^{-3}		
[7 × 8]			1.0×10^{-6}	5.0×10^{-1}
9. <i>B. pumilus</i> IF012110	8.4×10^8	3.0×10^{-4}		
10. <i>B. subtilis</i> LMHA(pTP4)	3.1×10^8	3.3×10^{-3}		
[9 × 10]			9.6×10^{-8}	4.4×10^{-4}

a. ポリエチレングリコール処理した後のプロトプラストをHCP-3寒天培地上に塗沫し、4-6日 30°Cで培養した。出現した再生体をクロラムフェニコールを含んだNA培地上にレプロリカし、Ade⁺Cm^r 細胞融合体の数を1-2培養後計数した。

b. 細胞融合頻度 (表 3-2 参照)。

DNA が移入した結果生じたものであると考えられる。同様な結果が、また B. subtilis LMHA (pTP4) と B. megaterium A または B. pumilus IF012110 との間の細胞融合において得られた。上記の異種間細胞融合方法は外から加えたテオキシリボヌクレアーゼによって影響を受けなかつた。

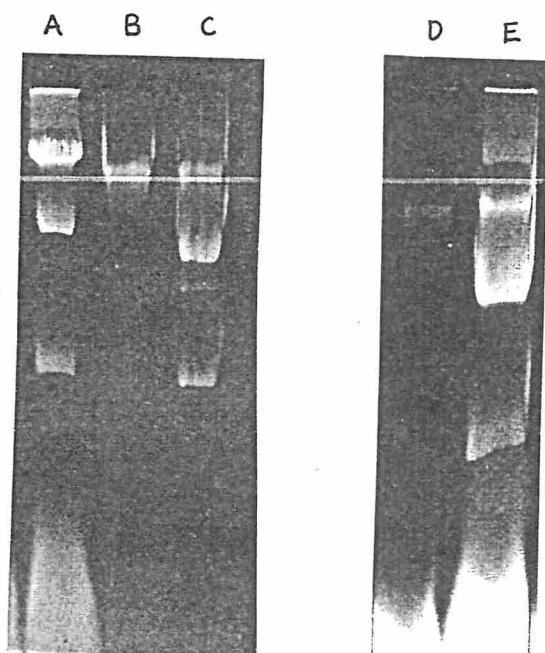


図 3-1. B. subtilis LMHA (pTP4) と B. amyloliquefaciens F および B. licheniformis FD0120 との交雑よりの細胞融合体中で見出されるプラスミド pTP4 のアガロースゲル電気泳動。A, B. amyloliquefaciens F (pTP4); B, B. amyloliquefaciens F; C, 対照 (pTP4); D, B. licheniformis FD0120; E, B. licheniformis FD0120 (pTP4)。

すなわち、B. subtilis LMHA (pTP4) と B. amyloliquefaciens 23845 または B. licheniformis FD0250 との間の細胞融合頻度はポリエチレングリコール処理の段階で $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のデオキシリボヌクレアーゼ I を加えても減少しなかった。

4. B. subtilis と B. licheniformis との間の異種間組換え B. subtilis LMHA (pTP4) (leuA8、metB5、hisA3、purA1b) と B. licheniformis FD0250 (his-6、pepA1) との間の細胞融合より得られた 142 個の Ade^+ Cm^r 融合体の非選択符号 (leuA8、metB5、hisA3、his-6) の分離を調べたところ、met⁺ leu⁺ His⁻ 118 個、met leu His⁻ 23 個、met⁺ leu⁺ His⁺ 1 個であった。非選択および選択符号の復帰突然変異の出現頻度は 10^{-8} 以下である。すなわち、142 個の Ade^+ Cm^r 融合体のうち 24 個は異種間染色体の組換え体である。2 個の連関していない metB と leuA 遺伝子が同時に組換えを起こす可能性は極めて少ないので、23 個の pur⁺ met leu His⁻ Cm^r 株は、B. subtilis LMHA (pTP4) の pur⁺ 組換え体と考えられる。同様な理由から、pur⁺ met⁺ leu⁺ His⁺ Cm^r クロ-シは、B. licheniformis FD0250 (his-6、pepA1) の His⁺ 組換え体と考えられる。

B. licheniformis HM (his-6、met、pepA1) と B. subtilis YSII (purB6、arg-15、leuB8) との間の異種間染色体の組換え体を非選択符号として使用したアミノ酸あるいは核酸塩基 3 種類を加えた HC*P-3 寒天培地上で直接

選択した。組換え体は選択可能な6種の組合せのうち5個より 2.9×10^{-7} から 2.6×10^{-8} の頻度で出現した(表3-5)。

表3-5. B. subtilis YSII (purB6, leuB8, arg-15) × B. licheniformis HM (his-6, pepA1, met) 交雑^aから得られた細胞融合体の非選択符号の分離

選択符号	高融合頻度		示した非選択符号を持つ数					
	融合体		<u>purA</u>	<u>arg</u>	<u>his</u>	<u>leu</u>	<u>met</u>	No.
	初発菌体	最少再生体						
<u>Leu</u> ⁺ <u>Met</u> ⁺	2.6×10^{-8}	7.0×10^{-5}	+	-	+			1
			-	-	+			2 ^b
<u>Arg</u> ⁺ <u>Met</u> ⁺	1.3×10^{-7}	3.5×10^{-4}	+		+	+		1
			+		+	-		1
			+		-	-		1
<u>Ade</u> ⁺ <u>Met</u> ⁺	2.4×10^{-7}	6.5×10^{-4}		+	+	+		2
				+	+	-		2
				-	+	-		2 ^b
				-	+	+		1
<u>Leu</u> ⁺ <u>His</u> ⁺	2.2×10^{-7}	6.0×10^{-4}	+	+			+	3
<u>Ade</u> ⁺ <u>His</u> ⁺	2.9×10^{-7}	8.0×10^{-4}		-			+	1
				+			-	1
				-			-	1
				-			-	1
<u>Arg</u> ⁺ <u>His</u> ⁺	- ^c	- ^c						1

a. B. subtilis YSII および B. licheniformis HM の ml当たりの生菌数はそれぞれ 8.4×10^8 と 9.0×10^8 個であった。YSII と HM の再生頻度はそれぞれ 5.9×10^{-3} と 7.1×10^{-4} であった。選択および非選択符号の復帰突然変異の出現頻度は 10^{-8} 以下である。

b. 1個の符号による組換え体と思われる。

c. 細胞融合体は得られていない。

得られた組換え頻度は、同種間組換え頻度より 100-1000 倍低い。

すべての選択した組換え体の非選択符号の分離を調べた結果を表 3-5 に示した。数は少ないが、Ade⁺Met⁺組換え体 8 個は、可能な 8 種組換え型のうち 5 種に分かれている。これらのこととは異種間で染色体の組換えが多数の部位で生じることを強く示唆している。

第 4 節 考 察

B. megaterium 同種間細胞融合の 2 遺伝子間の組換えの頻度を調べることにより、ilv-1 と arg-1 間、gly-1 と trp-1 間で強い連関を ilv-2 と thr-1 間で連関関係を見出した。Hennerk & Hoch によって報告⁽⁷³⁾されている B. subtilis 360° 染色体地図で ilvB,C と arg 間が 11°、glyA と trpE 間が 2.5°、ilvB,C と thrA 間が 40.5° の連関が認められる。両菌株間染色体の trp-his 間での Callahan らによつて報告された⁽⁷⁴⁾ 連関の事実は今回得られた結果とあわせ、両菌株の遺伝子座位にかなりの類似が見い出されるものと予想される。Vary らによつて報告^(75,76)された B. megaterium の普遍形質導入フージ MP13 は trp-his 間で約 0.5 の同時形質導入率を示す。一方、B. subtilisにおいて DNA による形質転換により trp-his 間で約 0.5 の同時形質転換率が得られ、B. megaterium

染色体符号の配置と比較して興味深い。このように、B. megaterium の染色体地図作製において、プロトプラスト融合により長い距離の連関関係が、MP13アージにより短い距離の連関関係が得られると考えられる。

Bacillus 属細菌の間で、染色体DNAの相同性は変化に富んだものであることが報告されている。⁽⁷⁷⁻⁸⁰⁾ このうち、B. subtilis、B. amyloliquefaciens、B. licheniformisおよびB. pumilusは他のBacillus属細菌と比べると互いで近縁で7-36%の高い相同値が明らかによって報告されている。⁽⁷⁹⁾ 上記Bacillus属細菌の異種間形質転換もYoungとWilson⁽⁷⁸⁾および関ら⁽⁸¹⁾によって報告されている。

PerlakとThorne⁽⁸²⁾はB. licheniformis 染色体の遺伝子の配置はB. subtilisのそれと比較的類似していることを報告している。さらにB. subtilis trpC 遺伝子はB. licheniformisおよびB. pumilusの遺伝子と相補的であることも報告されている。⁽⁶⁶⁾ それゆえ、B. subtilisとB. licheniformisとの間の染色体部位で異種間組換えがプロトプラスト融合により生じうると思われる。

第5節 要 約

ポリエチレングリコールで誘導したプロトプラスト融合により、B. subtilis、B. licheniformisおよびB. megateriumの同種間細胞融合のみならず、B. subtilisと

数種の Bacillus 属細菌 (B. amyloliquefaciens、B. licheniformis、B. megaterium および B. pumilus) との間で異種間細胞融合を見出した。B. subtilis YSII と B. licheniformis HM との間で異種間染色体組換えを認めた。B. megaterium 同種間細胞融合より得られる組換え体の非選択符号を調べることにより、次のアミノ酸要求性遺伝子間 (ilv-1 と arg-1、ilv-2 と thr-1、および gly-1 と trp-1) に連関を認めることができた。

第4章 高頻度再生法とその応用

第1節 緒言

Bacillus subtilis プロトプラストから桿状栄養細胞への再生頻度は、浸透圧を調整した基礎培地 (HC 寒天培地、第1章第2節) にポリビニルピロリドンを加えると約1%に上昇した。一方 DeCastro-Costa と Landman⁽³⁶⁾ は、トリプシン処理と25%ゼラチンを含む再生寒天培地を用いてプロトプラスト当り60%前後の再生頻度を、Gabor と Hotchkiss⁽³⁷⁾ は 1%牛血清アルブミンを含むリゾチーム溶液で調製したプロトプラストを 0.5% ゼラチンと 5% 牛血清を含む再生培地に塗沫することにより約100% の再生頻度を得ている。上記二方法は非常に高い再生頻度を示すが再生に複雑な化合物を必要とする。それゆえ、HCP 寒天培地を基本とし、かつ高頻度に再生させうる方法について調べた。B. megaterium⁽³⁸⁾、Streptomyces⁽⁸³⁾、Saccharomyces cerevisiae⁽⁸⁴⁾ およびカビ⁽⁸⁵⁾からの再生には血液増補剤のような特殊な物質は必要なく培地を重層する方法が用いられている。それゆえ、高頻度再生法検索において重層法を、また寒天濃度、ポリビニルピロリドン濃度やプロトプラスト培養 (第1章第3節5) などについても調べた。さらに本章では B. subtilis における遺伝子座位の簡便な決定法—プロトプラスト融合から得ら

れる組換え体の染色体交差部位を知ることにより遺伝子座位を決定する一について論じる。

第2節 実験材料と実験方法

菌株およびプロトプラスミド 使用した菌株のリストを表4-1に示す。 B. subtilis プロトプラストの高頻度再生条件の検討には B. subtilis 168S (trpC2, strA) を使用した。細胞融合による遺伝子座位決定の際に用いた B. subtilis AC343 (purA, strA, metA, gltA, trpC2, leu-2, his-1) は B. subtilis 168S 由来の菌株である。purA は B. subtilis 168SA (第3章第2節参照) より由来する。met は metC3 と同時形質転換されかつホモシスティンにより回復されるので metA と結論した。さらに形質転換を用いて、leu-2 が ilvB と連鎖していること及び his-1 は hisH と連鎖せず hisA に連鎖していることを確認している。

培地 高頻度プロトプラスト再生に使用した HCP-3, HCP-1.5 および HCP-1 培地は、第1章第2節で述べた HC 培地 1l 当り 30, 15 および 10 g のポリビニルピロリドン (K90, 平均分子量 700,000 半井化学薬品株式会社、京都) をそれぞれ含む。HMP-1.5 培地は 5g のカゼミノ酸の代わりに 2g の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ と 1g のクエン酸ナトリウムを加えた以外 HCP-1.5 培地と同じである。それ

表 4-1. 菌株リスト

菌株	遺伝子型	起源および由来
B. <u>subtilis</u>		
168S	<u>trpC2</u> 、 <u>strA</u>	第1章
YS11	<u>purB6</u> 、 <u>arg-15</u> 、 <u>leuB8</u>	第1章
LMHA	<u>purA16</u> 、 <u>leuA8</u> 、 <u>hisA3</u>	第1章
	<u>metB5</u>	
AC327	<u>purB</u> 、 <u>his-1</u>	168S の誘導体
IA484	<u>metC3</u> 、 <u>lyt-2</u>	*a
AC333	<u>purB</u> 、 <u>lyt-2</u>	IA484 DNA による AC327 の His ⁺ Lyt ⁻ 形質転換体
AC343	<u>purA</u> 、 <u>strA</u> 、 <u>metA</u> 、 <u>gltA</u> 、 <u>trpC2</u> 、 <u>leu-2</u> <u>his-1</u>	168S の誘導体
AC370	<u>aroD120</u> 、 <u>argA</u> 、 <u>leu-2</u> <u>hisH2</u>	168S の誘導体。 <u>aroD120</u> は QB935 より由来
QB935	<u>trpC2</u> 、 <u>aroD120</u> 、 <u>lys</u>	閑 達治 博士 (81)
B. <u>amyloliquefaciens</u>		
23843	<u>wild-type</u>	第2章
B. <u>licheniformis</u>		
FD0120	<u>met-1</u> 、 <u>pepA1</u>	第2章
FD0250	<u>his-6</u> 、 <u>pepA1</u>	第2章
B. <u>megaterium</u>		
IAM1030	<u>wild-type</u>	第2章
B. <u>pumilus</u>		
IF012110	<u>wild-type</u>	第2章

*a. Bacillus Genetic Stock Center より分譲

それの寒天培地は特記しない限り、培地 1l 当り 8g の寒天を含む。

~~プロトプラストの再生~~ 第 1 章第 2 節で述べたよ
うに調製したプロトプラストを HCP-3 培地 1ml 中に懸濁し、30°C 3 時間静置する。適当に希釈したプロトプラスト 0.1 ml を HCP-1.5 寒天培地にのせ、4ml の同寒天培地を注ぎ拡げる。再生体数は 30°C 3-4 日培養後計数した。再生頻度は初発プロトプラスト当たりの再生体の割合として表わした。

~~プロトプラスト融合~~ 第 3 章第 2 節の方法を一部
改変して行った。プロトプラストを HCP-3 培地または
HCP-3 + ade 培地の 1ml に懸濁し、30°C 3 時間保温 (プロ
レインキュベート) する。10ml の SMM (第 1 章第 2 節)
を加え、4,000×g, 10 分遠心分離し、少量 (0.3-1.0 ml)
の SMM にプロトプラストを懸濁する。掛け合わせの親
株から調製したプロトプラスト 0.1 ml ずつを混合し、
1.8ml の 40% ポリエチレングリコール 4,000 (第 2 章第
2 節)-SMM 溶液を加え、0°C 1 分保つ。HCP-1.5 培地
で希釈し、HCP-1.5 または HCP-1.5 + ade 寒天培地にのせ、
4ml の寒天培地 (基底培地と同じ組成) で重層する。

~~プロトプラスト形質転換~~ プロトプラスト再生の
方法以外、基本的には第 2 章第 2 節と同じである。プロト

プロラストを 1 ml の SMM に懸濁し、0.1 ml のプラスミド DNA 溶液と 0.1 ml の SMM から成る溶液 0.2 ml を加える。0°C 2 分後、10 ml の SMM を加え、4,000 × g、10 分遠心分離し、プロトプロラストを HCP-3 1 ml で懸濁し、30°C 3 時間保温した。抗生素質耐性の発現に対しては、通常 30°C 1.5 時間保温を使用しているが、⁽⁹⁾ 高頻度再生の目的のため 3 時間保温に変更した。プロトプロラスト数の増加は、この間ではほとんど認められなかった。保温したプロトプロラストを適当に希釈し選択再生寒天培地に重層した。

第3節 結 果

1. プロトプロラストの高頻度再生 対数増殖期の
B. subtilis 168S からリゾーム処理して得たプロトプロラストを 3% ポリビニルピロリドン含有液体培地 (HCP-3 培地) 中で 30°C 3 時間保温後 1.5% - 2.0% ポリビニルピロリドンを含む HCP 寒天培地 (HCP-1.5, HCP-1.75 および HCP-2 寒天培地) 上へ重層した時、プロトプロラスト当たり 90% 以上の非常に高い再生頻度が得られた (図 4-1)。フレインキュベートがなければ再生頻度は約 50% に減少し、塗沫法では HCP-1 寒天培地で約 2% と重層法と比べ 20-30 倍再生が悪くなつた (図 4-1)。

図 4-2 にフレインキュベート時間とポリビニルピロリドン濃度の再生頻度に及ぼす影響を示した。5% ポリ

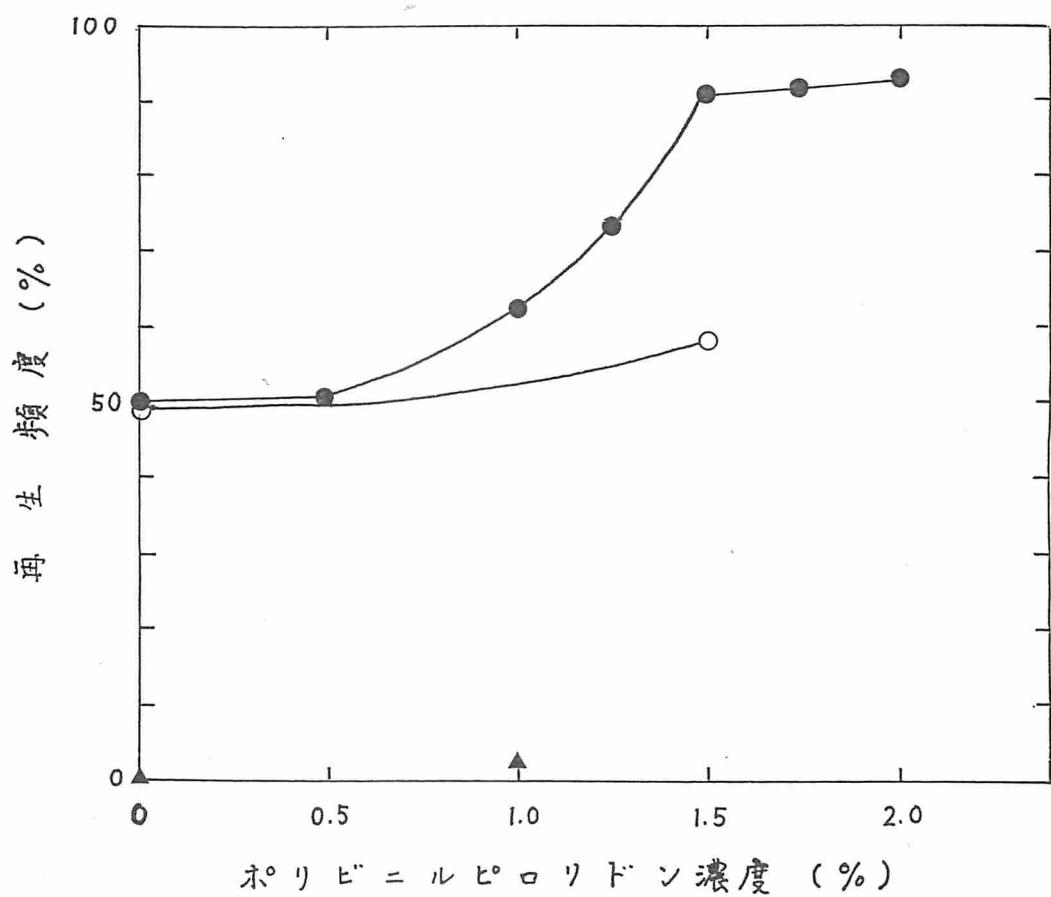


図4-1。 *B. subtilis* 168Sプロトプラストの再生に及ぼす重層法とポリビニルピロリドン濃度の影響。
B. subtilis 168Sプロトプラストを3つの部分にわけた。1部はHCP-3培地に懸濁し、30°C 3時間保温後、種々のポリビニルピロリドン濃度のHCP寒天培地に同上層培地で重層した。残りの2部はプロトプラストの保温なしにすぐにHCおよびHCP-1寒天培地に塗沫し、または重層した。再生培地上のコロニー数は30°C 4日後に計数した。記号：
▲, 塗沫; ●, 重層, 30°C 3時間保温; ○, 重層, 保温なし。

ビニルピロリドンを含む HCP-5 培地では、フレインキュベートの時間が短かくても高い再生頻度を示したが、高い粘性のため取扱いが容易でなかった。それゆえ、フレインキュベート条件は HCP-3 培地中 30°C 3 時間と設定した。

再生寒天培地中の寒天濃度の影響を調べたところ、0.8%、1.5% および 2.5% の寒天を含む HCP 寒天培地でそれぞれ 48、14 および 13% の再生頻度が、また 30°C 3 時間 HCP-3 培地で保温したプロトプラストを使用した時、100、40 および 26% の再生頻度が得られた。

最少寒天培地でのプロトプラスト再生に対するフレインキュベートの顕著な促進効果を表 4-2 に示した。すなまち、トリプロトファンを含む HMP-1.5 寒天培地で、フレインキュベートしたプロトプラストはそれをしないものに比べ約 500 倍高頻度に再生した。カザミノ酸を 50 µg/ml L-トリプロトファンを 100 µg/ml 含む HMP-1.5 寒天培地 (HCP-1.5 寒天培地) でアミノ酸要求性株 (トリプロトファン要求性株は除く) は増殖せずかつ再生頻度が表 4-2 に示すようにフレインキュベートしたプロトプラストで 74.3% と対照の HCP-1.5 寒天培地で得られる 92.6% に匹敵していた。それゆえ、細胞融合体を直選選択する培地として HMP-1.5 + カザミノ酸 (50 µg/ml) 寒天培地は有用である。

B. subtilis プロトプラストの高頻度再生法が他の Bacillus 属に対しても有効であるかどうかを調べるために、B. amyloliquefaciens 23843、B. licheniformis FD 0120、

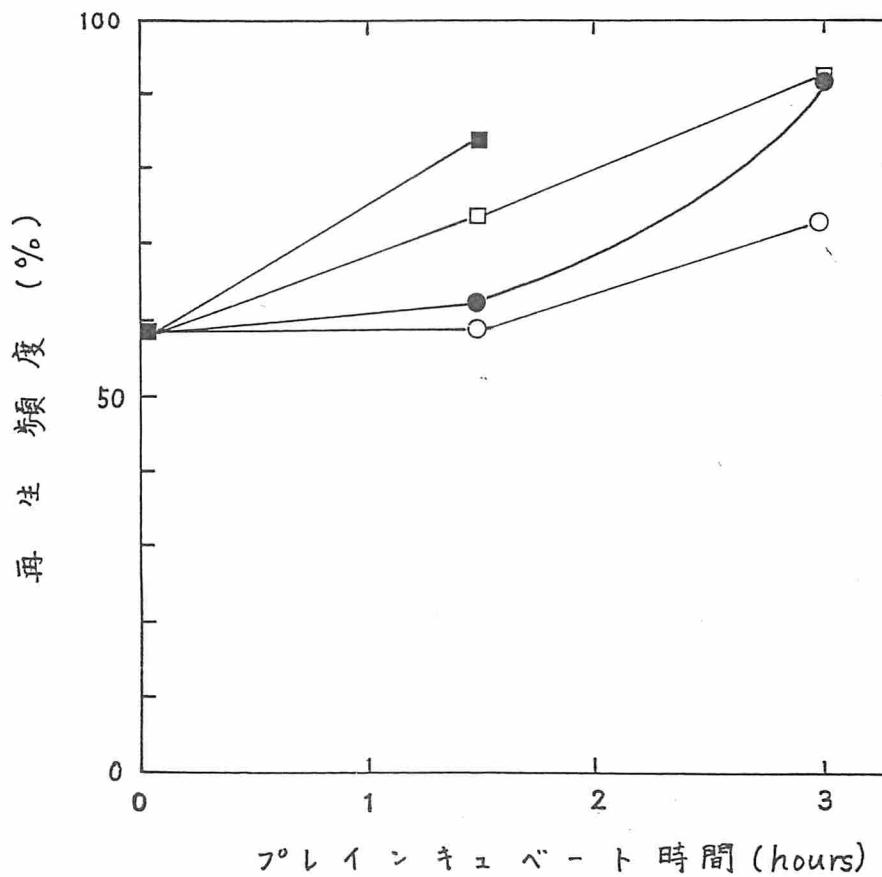


図4-2. 再生頻度に及ぼすポリビニルピロリドンの濃度とフレインキュベート時間の効果。 *B. subtilis* 168S プロトプラストを各種濃度のポリビニルピロリドンを含む HCP 培地中で 30°C 1.5 時間あるいは 3 時間保温した。 フレインキュベートしたプロトプラストの再生頻度は HCP-1.5 寒天培地に重層することにより出現するコロニーを計数して求めた。 記号: ○, 1% ポリビニルピロリドン; ●, 2%; □, 3%; ■, 5%。

表4-2. フロトプロラストの再生^aに及ぼすフレインキュベートとカサミノ酸の効果

時間(hr.)	再生頻度(%)		
	HMP-1.5 + L-トリゴトファン	HC*P-1.5 ^b	HCP-1.5
0	< 0.037	2.2	30.5
1	2.1	27.6	62.9
2	12.1	41.2	-
3	20.4	74.3	92.6

a. B. subtilis 168S フロトプロラストを HCP-3 培地で 0-3 時間保温し、SMM で洗浄後、重層法で上記寒天培地に拡げ培養した。

b. HC*P-1.5 寒天培地は、50 µg/ml カサミノ酸と 100 µg/ml L-トリゴトファンを加えた HMP-1.5 寒天培地である。

B. licheniformis FD0250、B. megaterium IAM1030 および B. pumilus IF012110 より 42°C 45 分リゾーム処理してプロトプロラストを調製し、続いて HCP-3 培地中 30°C 3 時間保温後 HCP-1.5 寒天培地に重層し、30°C 4 日培養後生じた再生体数を調べた。その結果、表4-3 に示すように、プロトプロラスト当り 13% から 68% の頻度で再生し、塗沫法で得られる頻度の 600-10,000 倍高い。B. licheniformis FD0120 プロトプロラストの再生頻度は 0.8 % と他の菌株と比べると低いが、塗沫法で得られる頻度と比べ約 100 倍

表 4-3。 Bacillus 属プロトプラストの再生頻度

菌株	プロトプラスト数 ml	再生頻度(%)	
		重層	塗沫
<u>B. subtilis</u> 1685	2.6×10^8	92	2.0
<u>B. amyloliquefaciens</u> 23843	1.5×10^8	68	6.9×10^{-3}
<u>B. licheniformis</u> FD 0250	6.5×10^7	60	7.7×10^{-2}
FD 0120	2.5×10^8	0.8	6.4×10^{-3}
<u>B. megaterium</u> IAM 1030	1.7×10^8	13	1.2×10^{-2}
<u>B. pumilus</u> IFO 12110	3.3×10^8	14	2.1×10^{-2}

高い。このように、Bacillus属の菌種により多少異なるけれども B. subtilis プロトプラストの高頻度再生法は、Bacillus属一般に適用できうると結論した。

2. 高頻度プロトプラスト再生法による融合および形質転換 高頻度プロトプラスト再生法を用いて、B. subtilis YS11 (purB6、arg-15、leuB8) と B. subtilis LMHA (purA16、metB5、hisA3、leuA8) との間のプロトプラスト融合

を調べた。YSII および LMHA よりのプロトプラストを HCP-3 + ade 培地でプレインキュベートし、遠心分離で集め、HCP-1.5 + ade 寒天培地および HCP-1.5 寒天培地に重層培養し、再生体数ならびに復帰突然変異体数を調べた。その結果、表4-4 に示すように、LMHA と YSII のプロトプラストはそれぞれ 75 % と 93 % の頻度で再生し、約 10^8 個のプロトプラストから復帰突然変異体は出現しない。両菌株のプロトプラストを混合後 40 % PEG-SMM 溶液を加え、HCP-1.5 あるいは PEG 溶液で希釈し、HCP-1.5 および HCP-1.5 + ade 寒天培地に重層した。30°C 4 日 培養後、 Ade^+ 細胞融合体数および再生体数（両親株の再生体と融合体の和）を調べた。その結果、細胞融合後の希釈液（PEG 溶液と HCP-1.5 培地）の違いにより、再生体数に約 25 倍の差があること、 Ade^+ 融合体数に約 15 倍の差があることを見出した（表4-4）。このようにポリエチレングリコール溶液の希釈は Gabor と Hotchkiss によって指摘されている⁽³⁷⁾ プロトプラストの生存率を下げるためか、もしくは過度の凝集のため、高収率で細胞融合体を得ることができなかつた。HCP-1.5 培地で希釈した場合に得られる 2.0×10^7 個/ml 再生体数、 2.1×10^6 個/ml Ade^+ 組換え体数、および 1.66×10^8 個/ml プロトプラスト数から計算すると、再生体数当り 11 %、初発プロトプラスト数当り 1.3 % で Ade^+ 組換え体が得られたことになる。この頻度は、第3章第3節1 で得られた値より約 100 倍高い。

高頻度再生法を用い、数種 Bacillus 属 プロトプラス

表 4-4。 B. subtilis YS11 (purB6、arg-15、leuB8) と B. subtilis LMHA (purA1b、leuA8、hisA3、metB5) との間のプロトプラスト融合

菌株 [交雫]	プロトプラスト の希釀液	プロトプラスト (No./ml)	再生体 (No./ml)	細胞融合体 (No./ml) ^a
<u>B. subtilis</u> LMHA	SMM	7.6×10^7	5.7×10^7	
<u>B. subtilis</u> YS11	SMM	9.0×10^7	8.4×10^7	
[LMHA × YS11]	PEG		8.4×10^5	1.4×10^5
	HCP-1.5		2.0×10^7	2.1×10^6

a. Ade^r 融合組換え体を HCP-1.5 寒天培地で選んだ。

トの形質転換を調べた。 B. subtilis 1685、B. amyloliquefaciens 23843、B. licheniformis FD 0120、B. megaterium IAM1030 および B. pumilus IFO 12110 からプロトプラストを調製し、pTP4 プラスミド DNA $0.1 \mu\text{g}$ を加え、40% ポリエチレンゲリユール溶液を加え、 0°C 2 分後、遠心分離した。 HCP-3 培地で 30°C 3 時間保温後、HCP-1.5 + cm 寒天培地に重層し、 30°C で静置培養した。その結果、表 4-5 に示すように、B. subtilis 1685 で最も効率よく ($1.3 \times 10^7/\mu\text{g}$ DNA) 形質転換を認めた。また Bacillus 属細菌により異なるが、 μg DNA 当りの形質転換効率は塗沫法での効率

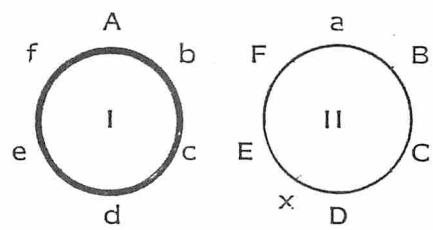
表 4-5。 Bacillus 属 プロトプラストのプロラスミド pTP4
DNAによる形質転換^a

菌株	プロトプラスト (No./ml)	再生体 (No./ml)	Cm ^r 形質転換体 (No./ml)
<u>B. subtilis</u> 168S	8.8×10^7	1.3×10^7	1.3×10^6
<u>B. amyloliquefaciens</u> 23843	2.3×10^8	8.4×10^6	1.9×10^3
<u>B. licheniformis</u> FD0120	4.5×10^8	2.0×10^5	3.6×10^2
<u>B. megaterium</u> IAM1030	2.1×10^8	2.8×10^6	2.3×10^3
<u>B. pumilus</u> IF012110	3.4×10^8	7.3×10^7	1.9×10^4

a. 形質転換に用いたDNA量は $0.1 \mu\text{g}$ である。

(第2章第3節表2-2)より 70-300倍高いことを認めた。

3. プロトプラスト融合による簡便な遺伝子座位決定法
プロトプラスト融合による簡便な遺伝子座位決定法を図4-3に示す。 b c d e f 符号を持つ B. subtilis 菌株Iと a 符号を持つ B. subtilis 菌株IIとの間でプロトプラスト融合し、 A⁺B⁺ 組換え体を選択する。座位を決める遺伝子 x は、菌株II染色体DNAの D E 間



X A B recombinants

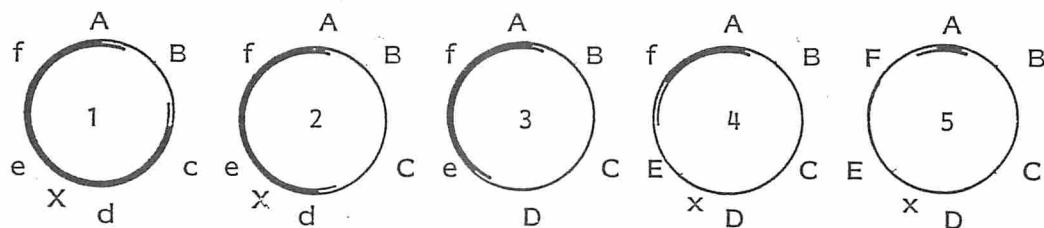


図 4-3。 B. subtilis プロトプラスト融合による遺伝子座位決定法。円は B. subtilis の染色体 DNA を表わす。A, B, C, D, E, および F はアミノ酸または核酸塩基合成に関する遺伝子を示し、X は座位未決定の遺伝子を示す。太円は菌株 I の染色体 DNA、円内の線は交差部位を示す。1, 2, 3, 4, および 5 は細胞融合より得られる A^+B^+ 組換え体で 2 回交差したと考えられるものである。

に位置すると仮定する。非選択符号 (c, d, e, f) の分離を調べ、いずれの領域で染色体交差が生じているかを判別し、 A^+B^+ 組換え体を群分けする。すなわち、図4-3に示したように2回交差したと考えられる組換え体は、1から5群になる。1群の組換え体は、c, d, e, f, A染色体領域は菌株ⅠよりBのそれは菌株Ⅱより成る雜種である。従ってXに関する表現型はXを示すことになる。同様に考えると群2ではX表現型を、群4と群5ではXを示す。一方 群3ではD E間の交差部位によりXまたはXの表現型を示す。

上記の遺伝子座位決定法を調べるために構築した多重栄養要求性株 B. subtilis AC343 (purA, strA, metA, gltA, trpC2, leu-2, his-1) と B. subtilis AC333 (purB, lyt-2)との間でプロトプラスト融合した。生じた Ade^+ 組換え体の非選択符号 (met, glt, trp, leu, his) を調べ、組換え体を群分けした(表4-6)。lyt-2突然変異遺伝子は、座位未決定でオートリシン活性の低下とNB培地で細胞形態が長い性質を示す。各遺伝子の染色体上の位置は360°地図で strA 10° , purB 53° , metA 112.5° , gltA 175° , trpC2 207° , leu-2 250° , his-1 306° および purA 353.5° である。表4-6に示すように、metA gltA trpC leu⁺ his⁺組換え体は Lyt⁺ もしくは Lyt⁻ であり、残りの2回交差した群は Lyt⁺のみまたは Lyt⁻のみである。これらのこととは lyt-2 遺伝子が trpC と leu-2間に位置することを強く示唆している。

表4-6. B. subtilis AC343 (purA, strA, metA, gltA, trpC, leu-2, his-1) と B. subtilis AC333 (purB, lyt-2) との掛け合せから得られた Ade^r 細胞体の非選択マーカー (strA, metA, gltA, trpC2, leu-2, his-1, lyt-2) の分離

示した非選択符号を持つ コロニーの数						最少交差 回数	Lyt-2の%出現頻度 (調べた数)
<u>met</u>	<u>glt</u>	<u>trp</u>	<u>leu</u>	<u>his</u>	数		
+	+	+	+	+	24	2	100 (6)
-	+	+	+	+	79	2	100 (12)
-	-	+	+	+	14	2	100 (4)
-	-	-	+	+	12	2	58 (12)
-	-	-	-	+	8	2	0 (7)
-	-	-	-	-	8	2	0 (6)
+	+	+	-	+	1	4	
+	+	+	-	+	1	4	
+	-	-	+	+	4	4	
-	+	+	-	+	3	4	
-	-	+	+	-	4	4	
-	-	+	+	-	5	4	
+	+	+	-	-	1	4	
+	-	-	-	+	2	4	
-	+	-	-	-	5	4	
-	-	+	+	-	1	4	
-	-	+	-	+	1	4	
-	+	-	-	-	3	4	
-	-	-	+	-	1	4	
+	+	-	+	-	1	6	
+	-	+	-	+	1	6	

このことを更に確かめるために trp と leu 間の遺伝子 aroD と lyt-2 との連関を形質転換で調べた。B. subtilis AC370 (aroD120、leu-2、argA、hisH) のコンピテント細胞に B. subtilis IA484 (lyt-2、metC3) よりの DNA を 0.01 μg 加え、Aro⁺ 形質転換体を得た。67 個の Aro⁺ 転換体はすべて Leu⁻ Arg⁻ His⁻ を示し、congression は生じていなか。Lyt の表現型を調べたところ表 4-7 に示すように 2 個が Lyt⁻ を示した。

以上のことより、プロトプラスト融合により、lyt-2 遺伝子が aroD と連関していることならびに遺伝子の位置を容易に決定できることを認めた。

表 4-7. 形質転換^aによる lyt-2 と aroD との連関関係

供与菌 (菌株)	受容菌 (菌株)	選択 符号	組換え体 ^b	
			クラス	数
<u>metC3</u> 、 <u>lyt-2</u> (IA484)	<u>aroD120</u> 、 <u>hisH</u> <u>argA</u> 、 <u>leu-2</u> (AC370)	AroD ⁺	Lyt ⁺	65
			Lyt ⁻	2
		計		67

a. 供与菌 DNA 濃度は 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

b. 組換え体はすべて hisH、argA、leu-2 株である。

第4節 考察

B. subtilis 168S プロトプラストを HCP-3 培地で 30°C 3 時間保温し、HCP-1.5 寒天培地に重層後培養することによりプロトプラスト当り 90% 以上の再生頻度が得られた（図 4-1）。保温しないプロトプラストの再生頻度でも、ホリビニルヒドロキシンの有無にかかわらず約 50% を示し、塗沫法と比べると約 25 倍高い。再生を促進すると考えられている硬寒天の条件で重層し再生頻度を調べたがむしろ軟寒天の重層より低い。これらのこととは、軟寒天を重層することによって細胞壁構成成分がプロトプラスト周辺で保持される⁽¹⁵⁾だけでなく生理的な状態が変化することにより細胞壁合成、プロトプラスト分裂、L型細胞への移行が促進され再生頻度が高くなることを示唆している。

Gabor と Hotchkiss が用いている 0.5% ゼラチンと 5% 仔牛血清を含む再生培地⁽³⁷⁾では、栄養要求性遺伝子を持つ菌株プロトプラストは増殖する。また Sanchez-Rivas⁽⁸⁶⁾ の mRI および mR2 再生培地（0.5% 馬血清を含む）では多重栄養要求性遺伝子を持つ菌株に限り増殖しない。それゆえ、栄養要求性遺伝子を持つ菌株が増殖できない HMP-1.5 + カサミン酸（50 µg/ml）寒天培地は、細胞融合より得られる組換え体を直接選択することができ、特に有用と思われる。

染色体上に分散した遺伝子変異を多数持つ突然変異体 (AC343) を構築した。それと座位未決定遺伝子を持つ菌株との間でプロトプラスト融合し、組換え体の非選択遺伝子の分離を調べ染色体交差部位を知り、組換え体を群分けする。各々の群の組換え体の座位未決定遺伝子の表現型を調べ座位決定する。この座位決定法を *B. subtilis* AC343 (purA、strA、meta、gltA、trpC2、leu-2、his-1) と *B. subtilis* AC333 (purB、lyt-2) のプロトプラスト融合で調べたところ、lyt-2 遺伝子を trpC2 と leu-2 間に認めることができた。上記方法が可能であるのは、180 個の Ade⁺ 組換え体のうち、最少交差回数が 2 回と考えられる株 145 株、4 回および 6 回と考えられるものがそれぞれ 33 株および 2 株であること (表 4-6)、すなわち、プロトプラスト融合において、組換えは 2 回交差が大部分であることによる。この手法は、従来の PBSI ラジ形質導入法で用いられる連鎖を調べる原理とは異なり、簡便であると考えられる。

第 5 節 要 約

B. subtilis プロトプラストを HCP-3 培地で 30°C 3 時間保温後、HCP-1.5 寒天培地に重層し、30°C で培養するとプロトプラストはほとんどすべて桿状生育細胞へ復帰した。この高頻度再生法は、数種 *Bacillus* 属に対しても、

効果的であった。さらにこの再生法は細胞融合や形質転換に対しても効果的で、前者では B. subtilis YSII と B. subtilis LMHAとの細胞融合でプロトプラスト総数当り 1.3 %、再生体総数当り 11% の高頻度で Ade^t組換え体が得られた。後者では pTP4 プラスマド μ g DNA 当り B. subtilis 16S の Cm^r 形質転換体が約 10^7 個得られた。プロトプラスト融合より得られる組換え体の染色体交差部位を知ることにより簡便に遺伝子座位が決定できることを認めた。

総 括

Bacillus natto や B. amyloliquefaciens など工業的に利用される Bacillus 属は多い。しかしながら、これら菌株の遺伝交換系はほとんど知られておらず、菌株の育種は困難であった。Bacillus 属プロトプラストの形質転換や細胞融合は上記問題点の解決法の一つであるが、プロトプラストの生理学的研究および桿状栄養細胞への再生法がまず第一に確立されなければならぬ。本論文は、B. subtilis プロトプラストの再生機構を調べその知見を Bacillus 属に応用し、プロトプラスト形質転換やプロトプラスト融合について論じたものである。ここで得られた結果は以下のように総括することができる。

第1章においてプロトプラストの増殖を促進するセラテン、馬血清、牛血清アルブミンなどの血液増補剤に加えて、新たに化学物質デキストランとポリビニルピロリドンを見出した。血液増補剤を含む液体培地でプロトプラストは膨張しきつ出芽による分裂をするが、それを含まない培地では分裂しない。プロトプラストの再生を遺伝的に調べるためにポリビニルピロリドンを含まない培地で高頻度に再生する rgn 突然変異体 (AG-5, AH-6, AH-8 および AA-7) 4 株を分離した。このうち、AG-5 と AH-6 突然変異は cysA 遺伝子に連関していた。rgn

突然変異体は細胞壁成分が異なると思われ、従って鞭毛欠損、隔壁形成の遅れ、オートリシン活性の低下および分泌酵素の1種プロテアーゼ生産に影響を及ぼす。これら性質のうちオートリシン活性の低下によりプロトプラストが細胞壁合成の方向に向かうという De Castro-Costa と Landman らの再生に関する作業仮説⁽³⁶⁾と矛盾しない。

第2章においてプロトプラスト形質転換法は B. subtilis のみならず B. amyloliquefaciens、B. licheniformis、B. megaterium および B. pumilus に対しても有効な手法であることを見出した。プラスミド pTP4 は上記菌株中で複製、維持されかつクロラムフェニコール耐性を発現するので有用なベクターである。プロトプラスト形質転換でもプラスミド pJKK310 の欠失が recE4、rM mM に依存することなく生じた。また DNA クローニングにおける挿入不活化ベクター プラスミド pAC1 および pAC2 を作製した。

第3章ではプロトプラスト融合について調べ、B. subtilis、B. licheniformis、B. megaterium 同種間細胞融合ならびに B. subtilis と B. amyloliquefaciens、B. licheniformis、B. megaterium および B. pumilus との異種間細胞融合を認めた。B. megateriumにおいて、ilv-1 と arg-1、ilv-2 と thr-1、gly-1 と trp-1との間に

連鎖を認めた。この連鎖と似た関係が B. subtilis 染色体で見出されており (glyA-trpEDCBA, ilvBC-argA, ilvB,C-thrA), B. licheniformis と B. subtilis で報告されている⁽³²⁾ ような遺伝子配列の類似性が B. megaterium においても存在するように思われる。

第4章では、プロトプラストを最大限利用するために B. subtilis の再生頻度を高める条件を検索した。B. subtilis プロトプラストを HCP-3 培地で 30°C 3 時間保温後、HCP-1.5 寒天培地に同培地を重層することにより、ほぼ 100% の再生法を開発した。この高頻度再生法と形質転換法または細胞融合法とを組合せることで、細胞融合体や形質転換体を高頻度で分離できた。HMP + カサミノ酸 (50 µg/ml) 寒天培地を用いるヒアミノ酸要求性遺伝子を指標として直接高頻度に融合体が選択できうる。さらには連鎖関係を直接的に選択することなしにプロトプラスト融合より得られる組換え体の染色体交差部位を知ることから簡便に遺伝子座位を決定する方法を見出した。

以上の諸結果より、プロトプラストを用いる細胞融合、形質転換法は B. subtilis のみならず Bacillus 属一般に有効な方法であると結論できる。

B. subtilis あるいは Bacillus 属プロトプラストを利用する上で最も重要な基本操作の一つは、プロトプラストの再生法である。血液増補剤を含む寒天培地の重層で、球状プロトプラストは膨張し、出芽による分裂を繰り返した後、約24時間後集団の中から桿状細胞が出現するという様式でかっぽほほ100%再生頻度で復帰した。非常に稀に出芽した場所から桿状細胞へ伸長して復帰する場合が認められ、液体培地中でも生じることを著者らは最近見出した。寒天培地とは異なり液体培地ではL型細胞への移行はほとんど見られず球状のままである。それゆえ再生の割合は極端に低いと考えられる。B. megaterium の再生様式に、球状プロトプラストから直ちに桿状細胞へ復帰するものがある。⁽³⁹⁾ プロトプラストから細胞壁前駆体の合成それに続く修復合成が頻繁に起こるようと思われるが再生頻度は約20%前後である。B. subtilis の再生速度の早い突然変異体の分離、液体培地でも高頻度に再生する突然変異体の分離および両者の性格づけ、B. megaterium の遺伝背景の違いなどを理解できうるならば、100%の再生率でプロトプラストの直ちの復帰も可能なようには著者には思われる。

Bacillus subtilis におけるプロトプラスト形質転換は、コンピテント細胞の形質転換と異なり幾つかの大きな特徴を持つ。プラスミドDNAはモノマーでも閉鎖環状

型で取り込まれ⁽¹⁰⁾ 従って非常に効率よくプロトプラストに移入される。たとえば pTP4 および pJKK310 プラスミドの μ g DNA 当り約 10^7 個、約 2×10^4 DNA 分子に 1 個 形質転換体を得ることができた（表2-4 および表4-5）。これとは逆に宿主染色体 DNA の転換体が得られるることは稀である。⁽⁹⁾ 最近、ポリエチレングリコール (PEG) のプロトプラストに対する効果は従来報告されていいるプロトプラスト融合を誘導する⁽¹¹⁾ だけでなく高分子化合物（リポソーム等）を細胞内へエンドサイトーシス様の機構で取り込むことにもあることが報告された。⁽⁸⁷⁾ もしも後者の場合で、供与体 DNA の構造とは無関係に取り込まれるならば、宿主染色体 DNA の形質転換頻度の低さは、二本鎖 DNA 間の対合、組換えが起こりにくいためか、もしくは、取り込まれる際の DNA 構造の変化によるものと考えられる。低頻度ながらも染色体 DNA のプロトプラスト形質転換体が得られたとへう Levi-Meyrueis らの報告⁽⁸⁸⁾ は、彼らの使用した菌株が組換え能の高い菌株であるように思われる。

DNA クローニングの宿主ベクター系として B. subtilis を宿主、S. aureus 由来のプラスミド (pTP4, pUB110 および pCI94) ならびにその誘導体^(65, 66) (pAC1) をベクターに用ひプロトプラスト形質転換法と組み合わせると以下の理由から特に有用であると思われる (i) プラスミド形質転換効率⁽⁹⁾ は E. coli の形質転換率⁽⁸⁹⁾ を継ぐ； (ii) 種々の

Bacillus 属細菌内でプラスミドは複製、維持され⁽⁵¹⁾広い宿主域を持つ；(iii)挿入不活性遺伝子を持つ^(65,66)；(iv)分泌ベクター⁽⁹⁰⁾でかつ調節支配でさうるベクターの改良が将来可能である。このようなベクター、移入技術などすぐれた面を持つが B. subtilis は E. coli と比べ組換えに関する研究が遅れている。本研究で見出した pJJK310 の欠失現象は特異的にテトラサイクリンを含む領域内に限られているのでそれゆえプラスミド分子内組換えから起くる欠失のように考えられる。すなわち、E. coli recE 遺伝子と似た機構⁽⁹¹⁻⁹³⁾により欠失が生じるようと思われ、B. subtilis 168S の遺伝背景は従って E. coli recE 遺伝子に相当する遺伝子欠損と考えられる。さらに pJJK523 プラスミドの宿主内への組込みに関する研究や E. coli recA 遺伝子に相当する突然変異体の分離等 B. subtilis の組換え能欠損に関する情報を教多く得ることとは、将来 DNA クローニング系を B. subtilis 等で考える場合重要な残された課題といえる。

最後に、細胞融合法と高頻度再生法の組合せた方法が Bacillus 属の育種および Bacillus 属間の研究に役立つことを著者は期待している。また簡便な遺伝子座位決定法が役立てばと考えている。しかしながら上記細胞融合法ですら 1 個の組換え体を得るのになお 100 前後のプロトプラストが必要である事実は多いなる改良の余地を残しているといえる。

参 考 文 献

1. Kao, K. N., and M. R. Michayluk. 1974. A method for high-frequency intergenetic fusion of plant protoplasts. *Planta.* 115: 355-367.
2. Schaeffer, P., B. Cami, and R. D. Hotchkiss. 1976. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 2151-2155.
3. Fodor, K., and L. Alfördi. 1976. Fusion of protoplasts of Bacillus megaterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 2147-2150.
4. Hopwood, D. A., H. M. Wright, M. J. Bibb, and S. N. Cohen. 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in Streptomyces. *Nature.* 268: 171-174.
5. Baltz, R. H. 1978. Genetic recombination in Streptomyces fradiae by protoplast fusion and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* 107: 93-102.
6. Kaneko, H., and K. Sakaguchi. 1979. Fusion of protoplasts and genetic recombination of Brevibacterium flavum. *Agric. Biol. Chem.* 43: 1007-1013.
7. Coetzee, J. N., F. A. Sirgel, and G. Lecatsas. 1978. Genetic recombination in fused spheroplasts of Providencia alcalifaciens. *J. Gen. Microbiol.* 107: 93-102.
8. Gotz, F., S. Ahrne, and M. Lindberg. 1981. Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in staphylococci. *J. Bacteriol.* 145: 74-81.
9. Chang, S., and S. N. Cohen. 1979. High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* 168: 111-115.

10. DeVos, W. M., and G. Venema. 1981. Fate of plasmid DNA in transformation of Bacillus subtilis protoplasts. Mol. Gen. Genet. 182: 39-43.
11. Mottes, M., G. Grandi, V. Sgaramella, U. Canosi, G. Morelli, and T. A. Trautner. 1979. Different specific activities of the monomeric and oligomeric forms of plasmid DNA in transformation of B. subtilis and E. coli. Mol. Gen. Genet. 174: 281-286.
12. Weibull, C. 1953. The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme. J. Bacteriol. 66: 688-695.
13. Landman, O. E., and S. Halle. 1963. Enzymatically and physically induced inheritance changes in Bacillus subtilis. J. Mol. Biol. 7: 711-738.
14. Clive, D., and O. E. Landman. 1970. Reversion of Bacillus subtilis protoplasts to the bacillary form induced by exogenous cell wall, bacteria, and by the growth in membrane filters. J. Gen. Microbiol. 61: 233-243.
15. Landman, O. E., and A. Forman. 1969. Gelatin-induced reversion of protoplasts of Bacillus subtilis to the bacillary form: biosynthesis of macromolecules and wall during successive steps. J. Bacteriol. 99: 576-589.
16. Landman, O. E., A. Ryter, and C. Frehel. 1968. Gelatin-induced reversion of protoplasts of Bacillus subtilis to the bacillary form: Electron-microscopic and physical study. J. Bacteriol. 96: 2154-2170.
17. Miller, I. L., R. Zsigray, and O. E. Landman. 1967. The formation of protoplasts and quasi-spheroplasts in noraml and chloramphenicol pretreated Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol. 49: 513-525.
18. Seki, T. 1979. Ph. D. Thesis, Genetic structure and taxonomy of the genus Bacillus. Department of Fermentation Technology, Osaka University.

19. Uozumi, T., T. Hoshino, T., K. Miwa, S. Horinouchi, T. Beppu, and K. Arima. 1977. Restriction and modification in Bacillus species. Genetic transformation of bacteria with DNA from different species, part I. Mol. Gen. Genet. 152: 65-69.
20. Hirokawa, H. 1972. Transfecting deoxyribonucleic acid of Bacillus bacteriophage φ29 that is protease sensitive. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 1555-1559.
21. Spizizen, J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of Bacillus subtilis by deoxyribonucleate. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44: 1072-1078.
22. Wyrick, P. B., and J. H. Rogers. 1973. Isolation and characterization of cell wall-defective variants of Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis. J. Bacteriol. 116: 456-465.
23. Takahashi, I. 1961. Genetic transduction in Bacillus subtilis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 5: 171-175.
24. Adelberg, E. A., M. Mandel, and G. C. C. Chen. 1965. Optical conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine in Escherichia coli K12. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18: 788-795.
25. Saito, H., and K. Miura. 1963. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. Biochim. Biophys. Acta. 72: 619-629.
26. Anagnostopoulos, C., and J. Spizizen. 1961. Requirements for transformation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 81: 741-746.
27. Fuwa, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. J. Biochem. (Japan). 41: 583-603.
28. Michel, J. F., and J. Millet. 1970. Physiological studies on early-blocked sporulation mutants of Bacillus subtilis. J. Appl. Bacteriol. 33: 220-227.

29. Fan, D. P. 1970. Cell wall binding properties of the Bacillus subtilis autolysin(s). *J. Bacteriol.* 103: 488-493.
30. Fan, D. P. 1970. Autolysin(s) of Bacillus subtilis as dechaining enzyme. *J. Bacteriol.* 103: 494-499.
31. Ayusawa, D., Y. Yoneda, K. Yamane, and B. Maruo. 1975. Pleiotropic phenomena in autolytic enzyme(s) content, flagellation, and protease in a Bacillus subtilis mutant. *J. Bacteriol.* 124: 459-469.
32. Doetsch, R. N. 1981. Determinative methods of light microscopy, p. 29. In. P. Gerhardt (ed.), *Mannual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
33. Young, F. E. 1967. Requirement of glucosylated teichoic acid for adsorption of phage in Bacillus subtilis 168. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58: 2377-2384.
34. Reilly, B. E., and J. Spizizen. 1965. Bacteriophage deoxyribonucleate infection of competent Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* 89: 782-790.
35. Burton, K. 1956. A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62: 315-323.
36. DeCastro-Costa, M. R., and O. E. Landman. 1977. Inhibitory protein controls the reversion of protoplasts and L-forms of Bacillus subtilis to the walled state. *J. Bacteriol.* 129: 678-689.
37. Gabor, M. H., and R. D. Hotchkiss. 1979. Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of Bacillus subtilis protoplasts. *J. Bacteriol.* 137: 1346-1353.
38. Fodor, K., G. Hadlaczky, and L. Alfördi. 1975. Reversion of Bacillus megaterium protoplasts to the bacillary form. *J. Bacteriol.* 121: 390-391.
39. Hadlaczky, G., K. Fodor, and L. Alfördi. 1976. Morphological study of reversion to the bacillary form of Bacillus megaterium protoplasts. *J. Bacteriol.* 125: 1172-1179.

40. Sekiguchi, J., N. Takada, and H. Okada. 1975. Gene affecting the productivity of α -amylase in Bacillus subtilis Marburg. *J. Bacteriol.* 121: 688-694.
41. Fein, J. E. 1979. Possible involvement of bacterial autolytic enzymes in flagellar morphogenesis. *J. Bacteriol.* 137: 933-944.
42. Bensi, G., A. Iglesias, U. Canosi, and A. Trautner. 1981. Plasmid transformation in Bacillus subtilis: The significance of partial homology between plasmid and recipient cell DNAs. *Mol. Gen. Genet.* 184: 400-404.
43. Canosi, U., A. Iglesias, and T. A. Trautner. 1981. Plasmid transformation in Bacillus subtilis: Effect of insertion of Bacillus subtilis DNA into plasmid pC194. *Mol. Gen. Genet.* 181: 434-440.
44. Ehrlich, S. D. 1978. DNA cloning in Bacillus subtilis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1433-1436.
45. Gryczan, T. J., S. Contente, and D. Dubnau. 1978. Characterization of Staphylococcus aureus plasmids introduced by transformation into Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* 134: 318-329.
46. Brown, B. J., and B. C. Carlton. 1980. Plasmid-mediated transformation in Bacillus megaterium. *J. Bacteriol.* 142: 508-512.
47. Martin, P. A. W., J. R. Lohr, and D. H. Dean. 1981. Transformation of Bacillus thuringiensis protoplasts by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 145: 980-983.
48. Alikhanian, S. I., N. F. Ryabchenko, N. O. Bukanov, and V. A. Sakanyan. 1981. Transformation of Bacillus thuringiensis subsp. galleriae protoplasts by plasmid pBC16. *J. Bacteriol.* 146: 7-9.
49. Imanaka, T., T. Tanaka, H. Tsunekawa, and S. Aiba. 1981. Cloning of the genes for penicillinase, penP and penI, of Bacillus licheniformis in some vector plasmids and their expression in Escherichia coli, Bacillus subtilis, and Bacillus licheniformis. *J. Bacteriol.* 147: 776-786.

50. Fuji, M., T. Imanaka, and S. Aiba. 1982. Molecular cloning and expression of penicillinase genes from Bacillus licheniformis in a thermophile Bacillus stearothermophilus. J. Gen. Microbiol. 128: 2997-3000.
51. Imanaka, T., M. Fujii, I. Aramori, and S. Aiba. 1982. Transformation of Bacillus stearothermophilus with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 149: 824-830.
52. Tanaka, T. 1979. recE-independent recombination between homologous deoxyribonucleic acid segments of Bacillus subtilis plasmids. J. Bacteriol. 139: 775-782.
53. Kreft, J., K. J. Burger, and W. Goebel. 1983. Expression of antibiotic resistance genes from Escherichia coli in Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet. 190: 384-389.
54. Kono, M., M. Sasatsu, and H. Hamashima. 1978. Transformation of Bacillus subtilis with staphylococcal plasmid DNA. Microbios Letters. 5: 55-59.
55. Appleyard, R. K. 1954. Segregation of lambda lysogenicity during bacterial recombination in Escherichia coli K12. Genetics. 39: 429-439.
56. Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heynecker, and H. W. Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene. 2: 95-113.
57. Novik, R. 1976. Plasmid-protein relaxation complexes in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 127: 1177-1187.
58. Bolivar, F. 1978. Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoR1 sites for selection of EcoR1 generated recombinant DNA molecules. Gene. 4: 121-136.
59. Jalanko, A., I Palva, and H. Soderlund. 1981. Restriction maps of plasmids pUB110 and pBD9. Gene. 14: 325-328.

60. Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
61. Guerry, P., D. J. LeBlanc, and S. Falkow. 1973. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 116: 1064-166.
62. Matubara, K., Y. Takagi, and T. Mukai. 1975. In vitro construction of different oligomeric forms of λdv DNA and studies on their transforming activities. *J. Virology.* 16: 479-486.
63. Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
64. Sharp, P. A., B. Sugden, and J. Sambrook. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry.* 12: 3055-3063.
65. Michel, B., E. Palla, B. Niaudet, and S. D. Ehrlich. 1980. DNA cloning in Bacillus subtilis. III. Efficiency of random-segment cloning and insertional inactivation vectors. *Gene.* 12: 147-154.
66. Keggins, K. M., P. S. Lovett, R. Marrero, and S. O. Hoch. 1979. Insertional inactivation of trpC in cloned Bacillus trp segment: Evidence for a polar effect on trpF. *J. Bacteriol.* 139: 1001-1006.
67. Sutcliffe, J. G. 1979. Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 77-90.
68. Shaw, W. V., L. C. Packman, B. D. Burleigh, A. Dell, H. R. Morris, and B. S. Hartley. 1979. Primary structure of a chloramphenicol acetyltransferase specified by R plasmids. *Nature.* 282: 870-872.
69. Keggins, K. M., P. S. Lovett, and E. J. Duvall. 1978. Molecular cloning of genetically active fragments of Bacillus DNA in Bacillus subtilis and properties of the vector plasmid pUB110. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1423-1427.

70. Bernhard, K., H. Schremph, and W. Goebel. 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in Bacillus cereus and Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 133: 897-903.
71. Dubnau, D., and C. Cirigliano. 1974. Genetic characterization of recombination-deficient mutants of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 117: 488-493.
72. Hofemeister, J., M. Israeili-Reches, and D. Dubnau. 1983. Integration of plasmid pE194 at multiple sites on the Bacillus subtilis chromosome. Mol. Gen. Genet. 189: 58-68.
73. Henner, D. J., and J. A. Hoch. 1980. The Bacillus subtilis chromosome. Microbiol. Rev. 44: 57-82.
74. Callahan, J. P., I. P. Crawford, G. F. Hess, and P. S. Vary. 1983. Cotransductional mapping of the trp-his region of Bacillus megaterium. J. Bacteriol. 154: 1455-1458.
75. Vary, P. S. 1979. Transduction in Bacillus megaterium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 88: 1119-1124.
76. Vary, P. S., J. C. Garbe, M. Franzen, and E. W. Frampton. 1982. MP13, a generalized transducing bacteriophage for Bacillus megaterium. J. Bacteriol. 149: 1112-1119.
77. Dubnau, D., I. Smith, P. Morell, and J. Murmur. 1965. Gene conservation in Bacillus species, I. conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54: 491-498.
78. Young, F. E., and G. A. Wilson. 1972. Genetics of Bacillus subtilis and other gram-positive sporulating bacilli, p. 77-106 In: Harvorson, H. O., R. Hanson, and L. L. Campell (eds) Spores V. American Society for Microbiology, Washington , D. C.
79. Seki, T., T. Oshima, and Y. Oshima. 1975. Taxonomic study of Bacillus by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization and interspecific transformation. Int. J. Syst. Bacteriol. 25: 258-270.
80. Seki, T., C-K. Chung, H. Mikami, and Y. Oshima. 1978. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus Bacillus. Int. J. Syst. Bacteriol. 28: 182-189.

81. Seki, T., H. Tsunekawa, K. Nakamura, K. Yoshimura, and Y. Oshima. 1979. Conserved genes in Bacillus subtilis and related species. J. Ferment. Technol. 57: 488-504.
82. Perlak, F. J., and C. B. Thorne. 1981. Genetic map of Bacillus licheniformis, p. 78-82. In: Levinson, H. S., A. L. Sonenshein, and D. J. Tipper (eds) Sporulation and germination. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
83. Shirahama, T., T. Furumi, and M. Okanishi. 1981. A modified regeneration method for Streptomycete protoplasts. Agric. Biol. Chem. 45: 1271-1273.
84. Hinnen, A., J. B. Hicks, and G. R. Fink. 1978. Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 1929-1933.
85. Schweizer, M., M. E. Case, C. C. Dykstra, N. H. Giles, and S. R. Kushner. 1981. Identification and characterization of recombinant plasmids carrying the complete qa gene cluster from Neurospora crassa including the qa-1⁺ regulatory gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 5086-5090.
86. Sanchez-Rivas, C. 1982. Direct selection of complementing diploids from PEG-induced fusion of Bacillus subtilis protoplasts. Mol. Gen. Genet. 185: 329-333.
87. Nagata, T., K. Okada, I. Takeda, and C. Matsui. 1981. Delivery of Tobacco mosaic virus RNA into plant protoplast mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes). Mol. Gen. Genet. 184: 161-165.
88. Levi-Meyrueis, C., K. Fodor, and P. Schaeffer. 1980. Polyethyleneglycol-induced transformation of Bacillus subtilis protoplasts by bacterial chromosome DNA. Mol. Gen. Genet. 179: 589-594.
89. Mandel, M., and A. Higa. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53: 159-162.
90. Palva, I. 1982. Molecular cloning of α -amylase gene from Bacillus amyloliquefaciens and its expression in Bacillus subtilis. Gene. 19: 81-87.

91. Kaiser, K., and N. E. Murray. 1979. Physical characterization of the "rac prophage". Mol. Gen. Genet. 175: 159-174.
92. Kaiser, K., and N. E. Murray. 1980. On the nature of sbcA mutations in E. coli. K12. Mol. Gen. Genet. 179: 555-563.
93. Cohen, A., and A. Laben. 1983. Plasmidic recombination in Escherichia coli K12: the role of recF gene function. Mol. Gen. Genet. 189: 471-474.
94. DasGupta, C., and C. M. Radding. 1982. Polar branch migration promoted by recA protein: effect of mismatched pairs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 762-766.

謝 辞

本研究の間 数多くの助言・指導して
いただきました 熊本工業大学 関口順一
助教授に心よりお礼申し上げます。

本研究の基礎となりました菌株分譲を心よく
お送り下さいました 大阪大学 工学部 岡田
弘輔教授、大嶋泰治教授、東京大学
齊藤日向教授、別府輝彦教授、東京薬
科大学 河野恵教授ならびに大阪大学
工学部 関達治博士に深甚なる感謝の意
を表します。

光学顕微鏡写真撮影に際し懇切なる御指導
をいただきました 熊本大学 薬学部 柴田元雄
教授に深謝いたします。さらに本研究に際し
大西和明君をはじめとする教室員の方々に
感謝いたします。

本論文に関する主な報告

1. Studies on regeneration media for Bacillus subtilis protoplasts
Agric. Biol. Chem., 45, 2887-2894 (1981).
2. Transformation of Bacillus protoplasts by plasmid pTP4 DNA
Agric. Biol. Chem., 46, 1617-1621 (1982).
3. Selection methods in bacilli for recombinants and transformants
of intra- and interspecific fused protoplasts
Arch Microbiol., 134, 303-308 (1983).
4. Properties of regeneration mutants of Bacillus subtilis
FEMS Microbiology Letters, 20, 425-428 (1983).
5. An improved method of protoplast regeneration for Bacillus species
and its application to protoplast fusion and transformation
Agric. Biol. Chem., 48, 651-655 (1984).