The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Bacillus属プロトプラストの再生とその応用
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ザミノ酸の影響　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化ベクターの作製　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 Bacillus 属におけるプラスミドDNAによるプロトプラスト形質転換　53
3. B. subtilis と E. coli シャトルベクタープラスミド　54
4. B. subtilis における挿入不活化ベクターの作製　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. Bacillus 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. *B. subtilis* と *B. licheniformis* 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. プロトプラストの高頻度再生 93
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 98
3. プロトプ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 Alfördi[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[10,11]、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 1)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（pJKK310 と pJKK523）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化符号（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チ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 のリゾチ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[14-17]、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。

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、固形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、その性格づけを行い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桿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* YS11[19]を用い、その突然変異体の性格づけのためにPBS1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。菌株およびファージリスト

菌株およびファージ	遺伝子型	起源および由来
菌株		
B. subtilis		
168S	trpC2、strA	* a
LMHA	purA16、leuA8、metB5、hisA3	*
YS11	purB6、arg-15、leuB8	*
AG-5	purB6、arg-15、leuB8、rgn-1	YS11のrgn突然変異体
AH-6	purB6、arg-15、leuB8、rgn-2	YS11のrgn突然変異体
AH-8	purB6、arg-15、leuB8、rgn-3	YS11のrgn突然変異体
AA-7	purB6、arg-15、leuB8、rgn-4	YS11のrgn突然変異体
PRA1	purB6、arg-15、leuB8、$\phi 29^r$	YS11の$\phi 29^r$自然突然変異体
PRA2	purB6、arg-15、leuB8、$\phi 29^r$	YS11の$\phi 29^r$自然突然変異体
PRA3	purB6、arg-15、leuB8、$\phi 29^r$	YS11の$\phi 29^r$自然突然変異体
PRA4	purB6、arg-15、leuB8、$\phi 29^r$	YS11の$\phi 29^r$自然突然変異体
PRA5	purB6、arg-15、leuB8、$\phi 29^r$	YS11の$\phi 29^r$自然突然変異体
CT6-1	cysA14、hisH2	QB944 (purA16, cysA14, trpC2)の誘導体
CT10-1	cysA14、strA、hisH2	QB944よりの誘導体
CT11-2	hisH2、	CT6-1のAG-5 DNAによるCys^+転換体
CT11-6	hisH2、rgn-1	CT6-1のAG-5 DNAによるCys^+Rgn^-転換体
CT11-12	hisH2、rgn-1	CT6-1のAG-5 DNAによるCys^+Rgn^-転換体
ファージ		
PBS1		*
$\phi 29$		** b

a. 関達治博士より分譲

b、斉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に 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、$(NH_4)_2SO_4$ 2g、KH_2PO_4 6g、K_2HPO_4 14g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 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 μg/mℓ および 40 μg/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、カザミノ酸 5g、L-トリプトファン 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培地はカザミノ酸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。PBS1ファージ粒子数測定に用いたY培地[23]は1ℓ当りNaCl 4g、K_2SO_4 5g、KH_2PO_4 1.5g、Na_2HPO_4 3g、酵母エキス1g、$MgSO_4$ 0.12g、$CaCl_2$ 0.01g、$FeCl_3$ 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20ml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 570nm）が0.4になれば25mlのNB培地に初発細胞濁度A570nm = 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20mlを遠心分離（7,200×g、10分）し、集めた細胞に4mlの250μg/ml濃度リゾチームを含むWyrickとRogersのSMM［0.5M サッカロース-0.02M マレイン酸緩衝液（pH6.5）-0.02M $MgCl_2$］[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。細胞濁度は 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 ネオパン SS（ASA 100）とニコンカメラ付属品でおこなった。

N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）突然変異処理　Adelbergの方法[24]に基づきNTG処理した。5mlのNB培地で37°C 14時間振盪培養した*B. subtilis* YS11（*purB6*、*leuB8*、*arg-15*）の培養液を20mlのNB培地に0.2ml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、200μg/ml濃度のNTGを含む0.1Mトリス-0.1Mマレイン酸緩衝液（pH6.0）10mlに懸濁し、全量を滅菌100ml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、1mlのNB培地に懸濁する。その0.1mlを5ml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の抽出は斉藤と三浦の方法[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1lから

遠心分離（7,200×g、10分）で細胞を集め、2 mg/ml リゾチームを含む 6 ml 0.5 M NaCl－0.1 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（pH 9.0）－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 の飽和フェノール液〔48 ml フェノールと 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×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 M NaCl－0.015 M クエン酸ナトリウム（1×SSC）に溶解し形質転換に用いた。

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×g、10分）で集め、形質転換培地 I（200 μg/ml カザミノ酸と 50 μg/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 μg/ml、核酸塩基は 100 μg/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 μg/ml カザミノ酸と 5 μg/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 μg/ml、核酸塩基は 100 μg/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（pH5.3）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I_2溶液（10% KIを含む1% I_2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。

プロテアーゼ活性の定量　プロテアーゼ定量の反応液[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 Na_2CO_3 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 × g、10 分）で集め、洗浄後、トリス-カリウム緩衝液（0.1 M トリス-0.1 M 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（ブランソン超音波破砕機、モデル 350）最高出力で2分間、超音波破砕し、1,000 × g、5 分遠心分離を行い、未破砕細胞を除き、その上澄を 27,000 × g、5分遠心分離し細胞壁を集める。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 3 M 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 nm = 0.2 となるようにし、A 540 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 1 ml、5% フェノール 2.5 ml、20% タンニン酸 1 ml から成る溶液 4.5 ml にフクシン（和光純薬工業株式会社、大阪）1.1 g、99.9 % エチルアルコール 10 ml から成る溶液 1 ml 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。

ファージ感受性試験　PBS1 および φ29 ファージの感受性はスポット試験によって調べた。

φ29 ファージ耐性突然変異体の分離　φ29 ファージ耐性突然変異体は Young ら[33・34]によって述べられたようにして B. subtilis YS11 および 168S より分離した。5 ml

の5 mM $MgSO_4$ を含む NB 培地（NB + 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の濃度になれば遠心分離（7,200×g、10分）で菌体を集め、7 mlのNB + Mg 培地に懸濁し、5×10^{10} φ29 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NB + Mg 培地に懸濁し、5×10^{10} φ29 ファージ粒子を加える。37°C 1時間保温後、更に 1×10^{10} φ29 ファージ粒子を加える。10倍希釈し、0.1 mlを 5×10^9 φ29 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単一コロニー分離する。

DNA含量の定量　DNA中に含まれるデオキシリボース量を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 μgのDNAを含むDNA溶液1 mlを加え、16時間30°C保温した。保温後、標準として2-デオキシアデノシンを用いA 600 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 3.4×10^{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 1.8×10^{8}/ml で浸透圧ショック耐性コロニー数は 15/ml であった。

受ける。*B. subtilis* YS 11 (*purB*6、*arg*-15、*leuB*8) および *B. subtilis* LMHA (*purA*16、*leuA*8、*metB*5、*hisA*3) 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* YS11 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

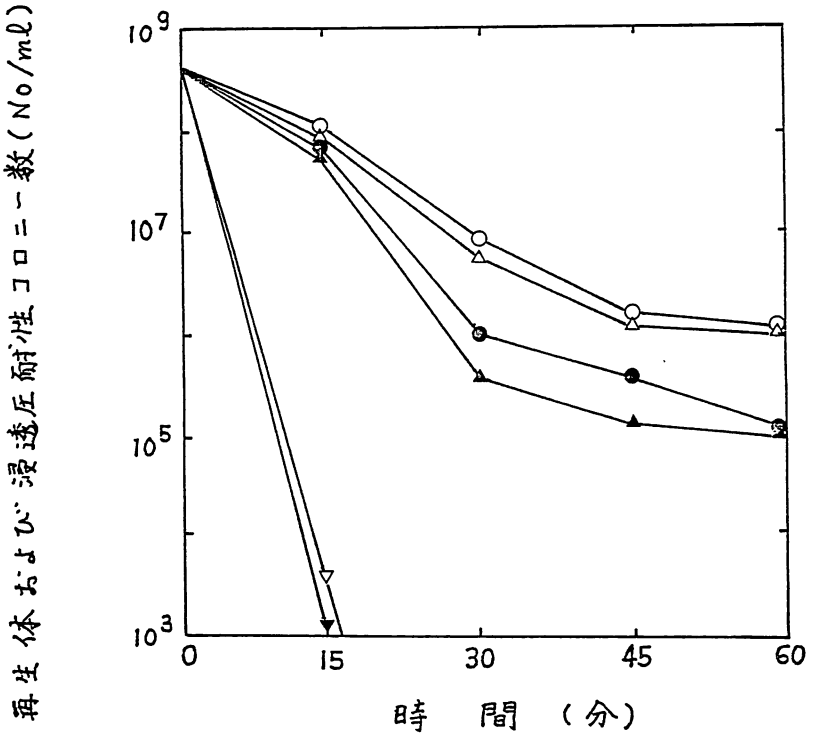

図1-1. リゾチーム処理による浸透圧耐性細胞数と再生体数の変化。 B. subtilis YS11 および B. subtilis LMHA の対数増殖期細胞を 250 μg/ml リゾチームを含む高張溶液中に懸濁し、42°C に保温した。試料を 15 分間隔でとりアデニンを含む HCP-3 および HC 寒天培地上に塗沫した。30°C 3-4日後、出現するコロニーを計数した。浸透圧耐性細胞：▽，YS11；▼，LMHA。再生体：○，YS11 HCP-3＋アデニン培地；●，YS11 HC＋アデニン培地；△，LMHA HCP-3＋アデニン培地；▲，LMHA HC＋アデニン培地。

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、YS11 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は、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に思われる。

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株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℃ 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. 血液増補剤と硬寒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1ℓ当り8gの寒天の代わりに25g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　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] らは報告している。B. subtilis 168S 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、細胞濁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－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ザミノ酸の影響　B. subtilis 168S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×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 μg/ml L-トリプトファンを含むHMP-3寒天培地（HMP-3＋L-トリプトファン）およびカザミノ酸濃度を変えた以外HCP-3培地と同じ$HC^{n}P$-3寒天培地に塗沫し再生頻度を調べた（表1-5）。L-トリプトファン添加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ザミノ酸量が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

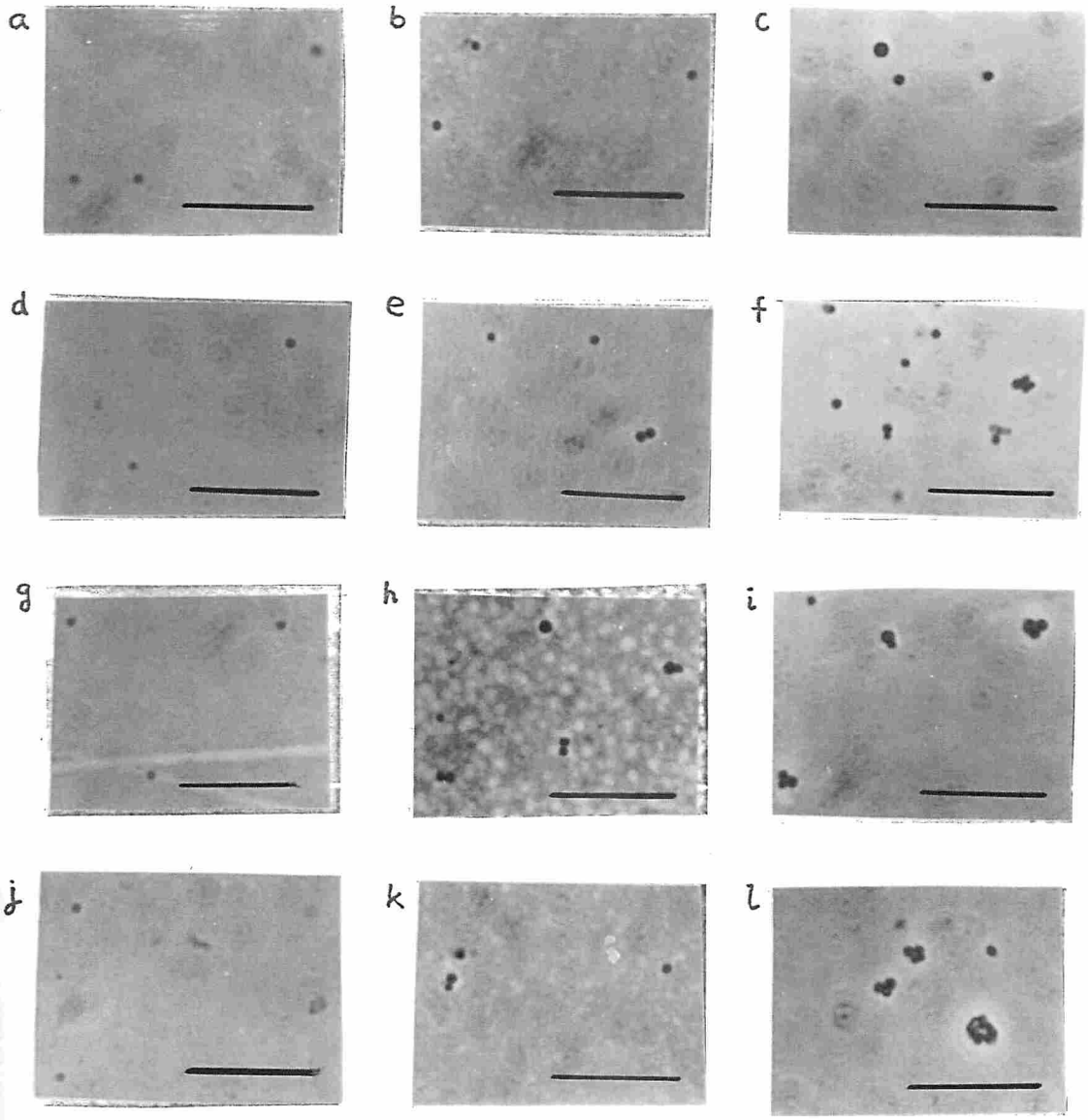

図1-2. HC, HCP-3, HCD-3 または HCH-10 液体培地中での *B. subtilis* 168S プロトプラスト および分裂中のプロトプラストの光学顕微鏡写真。 プロトプラストを HC, HCP-3, HCD-3 および HCH-10 培地中で 1.5時間, 7.5時間 および 13.5時間培養した。 記号: a, HC培地 1.5時間培養; b, HC培地 7.5時間培養; c, HC培地 13.5時間培養; d, HCP-3培地 1.5時間培養; e, HCP-3培地 7.5時間培養; f, HCP-3培地 13.5時間培養; g, HCD-3培地 1.5時間; h, 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 10μm 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. $HC^{n}P$-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. $HC^{e}P$-3 およびL-トリプトファン添加HMP-3寒天培地上で褐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. $HC^{e}P$-3 寒天培地上の再生頻度は、$(NH_4)_2SO_4$ 2g とクエン酸ナトリウム 1g を培地 1l 当り加えた $HC^{e}P$-3 培地($HC^{+e}P$-3 寒天培地)上で得られる値と同じである。

e. 100μg/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にし、再生をうながす、などの効果を持つように思われる。

$(NH_4)_2SO_4$ 2g と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、20mg/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<u>B. subtilis</u>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）栄養細胞を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1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（YS11）の諸性質

	菌株				
	YS11	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	$<2\times10^{-5}$	0.5	$<10^{-4}$	$<2\times10^{-5}$	$<10^{-5}$
ファージ感受性					
φ29	+[a]	+	+	+	+
PBS1	+[a]	−[b]	−	+	+
ガラクトース培地での増殖	+[c]	+	+	+	+

a. バクテリオファージ φ29 または PBS1 に対する感受性を示す。

b. PBS1 ファ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 ファージに耐性を示す 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 DeCastro-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 φ29 ファ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、φ29 ファ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 φ29 ファージ感受性で、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、一般形質導入ファージ 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 ファ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った。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に分離したところ、鞭毛を有し（図 1-3）、PBS1 ファージに感受性で、かつアデニン添加 HC およびアデニン添加 HCP-3 寒

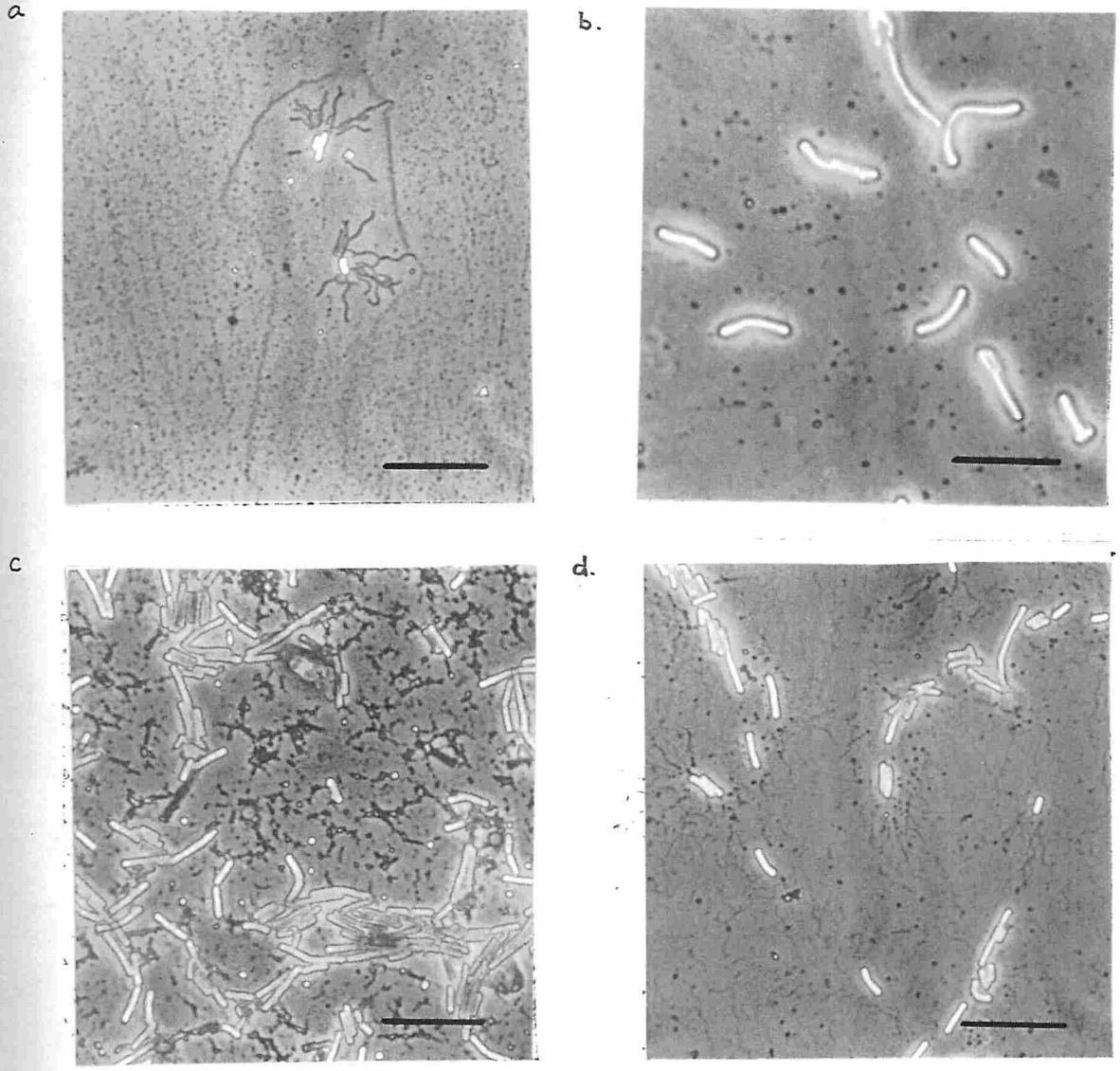

図1-3. 親株（YS11）、rgn-1 突然変異体（AG-5）、rgn-2 突然変異体（AH-6）および rgn-1 突然変異体の復帰突然変異体（DC4）の鞭毛染色後の光学顕微鏡写真。 NA 培地上で 30°C 14時間培養した試験菌体を実験材料と実験方法で述べたように鞭毛染色した。 記号と菌株: a, YS11; b, AG-5; c, AH-6; d, DC4。 バーの長さは 10 μm を示す。

天培地の再生頻度が親株，YS11，と同程度まで低下していた。AG-5 株の rgn-1 遺伝子の位置をプロトプラスト細胞融合法（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）よりコンピテント細胞を調製し、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、rgn 突然変異体の諸性質　De Castro-Costa と Landman は、再生はペプチドグリカンの合成と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 YS11、AG-5 および AG-5 より分離した Rgn^+ 復帰突然変異体，DC4 のオー

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

遺伝子型		選択	組換え体		推定される
供与菌（菌株）	受容菌（菌株）	符号	クラス	数	配列
purB arg-15 leuB rgn-1 (AG-5)	cysA hisH strA (CT10-1)	Cys^+	Str^r Rgn^+ [b]	136	rgn-1 — cysA — strA
			Str^r Rgn^- [b]	26	
			Str^s Rgn^+	123	
			Str^s Rgn^-	15	
			計	300	
purB arg-15 leuB rgn-2 (AH-6)	cysA hisH strA (CT10-1)	Cys^+	Str^r Rgn^+	37	rgn-1 — cysA — strA
			Str^r Rgn^-	8	
			Str^s Rgn^+	50	
			Str^s Rgn^-	5	
			計	100	

a. 供与菌DNA濃度は 0.01 μg/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，YS11，と比べ、約15%に減少していた（図1-4）。一方DC4株は YS11 の約80%に回復していた。YS11，AG-5 および DC4株の細胞壁から LiCl 処理で抽出したオートリシ

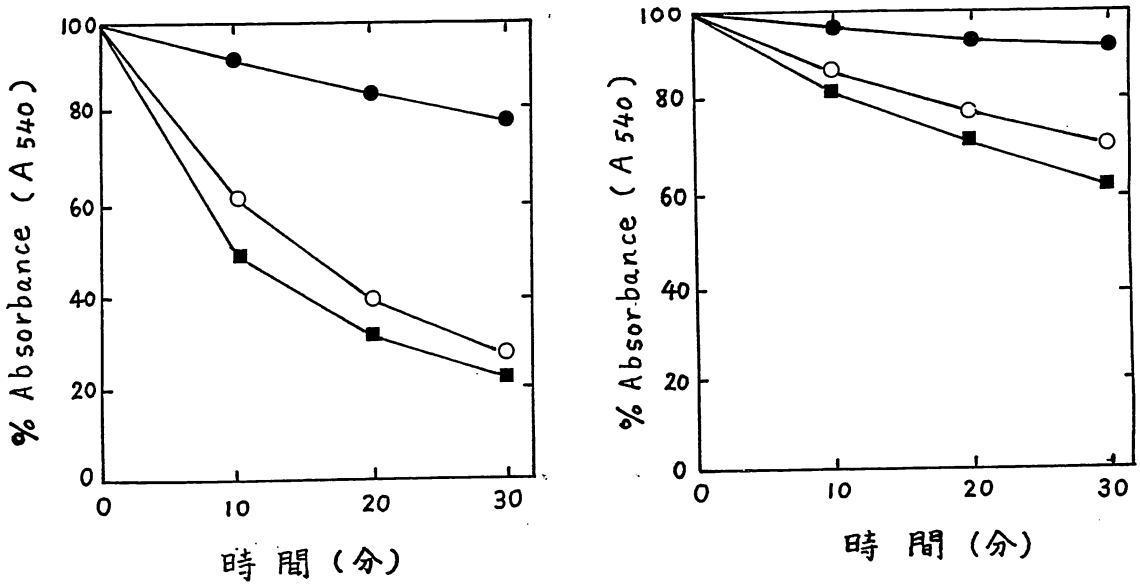

図1-4. 親株（YS11）、rgn-1 突然変異体（AG-5）および復帰突然変異体（DC4）における細胞壁結合オートリシンならびに細胞壁から LiCl で抽出したオートリシンの活性。 (A) 細胞壁に結合しているオートリシン; (B)細胞壁から LiCl で抽出したオートリシン。図1-4B において活性測定反応液中のオートリシンと細胞壁は同じ菌株から調製した。 記号: ■, YS11; ●, AG-5; ○, DC4.

ン活性測定も同じ結果を得た（図1-4）。以上の結果は、DeCastro-Costa と Landman の仮業仮説と矛盾しない。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、YS11 および DC4 のそれと比べオートリシン（YS11 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

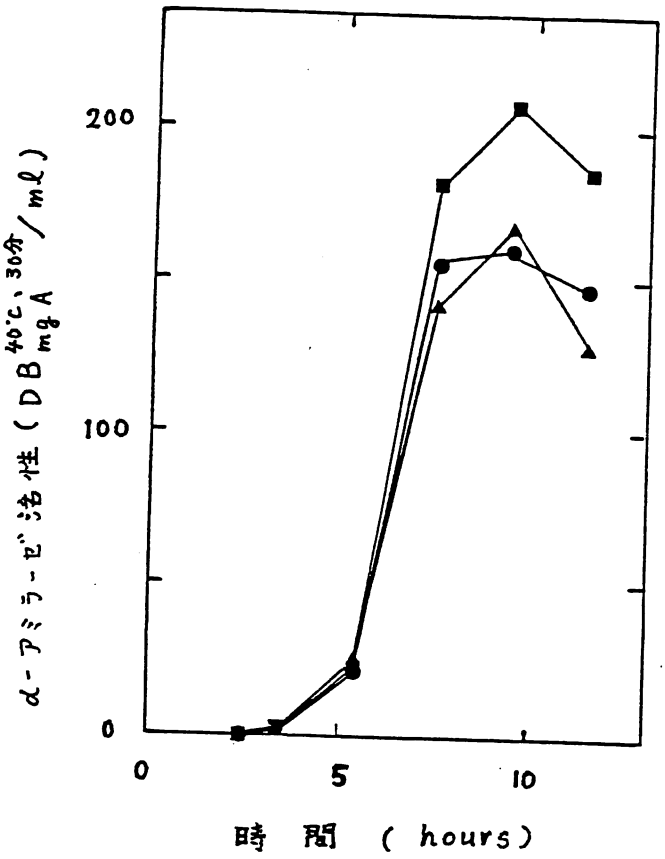

図1-5。　野生株と rgn-1 突然変異におけるα-アミラーゼ生産性。　α-アミラーゼ合成は 37°C NB 培地において調べた。rgn-1 突然変異以外同じ遺伝子型の形質転換体は CT6-1（cysA14、hisH2）受容菌の AG-5 DNA（purB6、arg-15、leuB8、rgn-1）による Cys^+ 形質転換より得た。
記号：●，CT11-2（hisH2）；■，CT11-6（hisH2、rgn-1）；▲，CT11-12（hisH2、rgn-1）。

（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<u>rgn</u>-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。

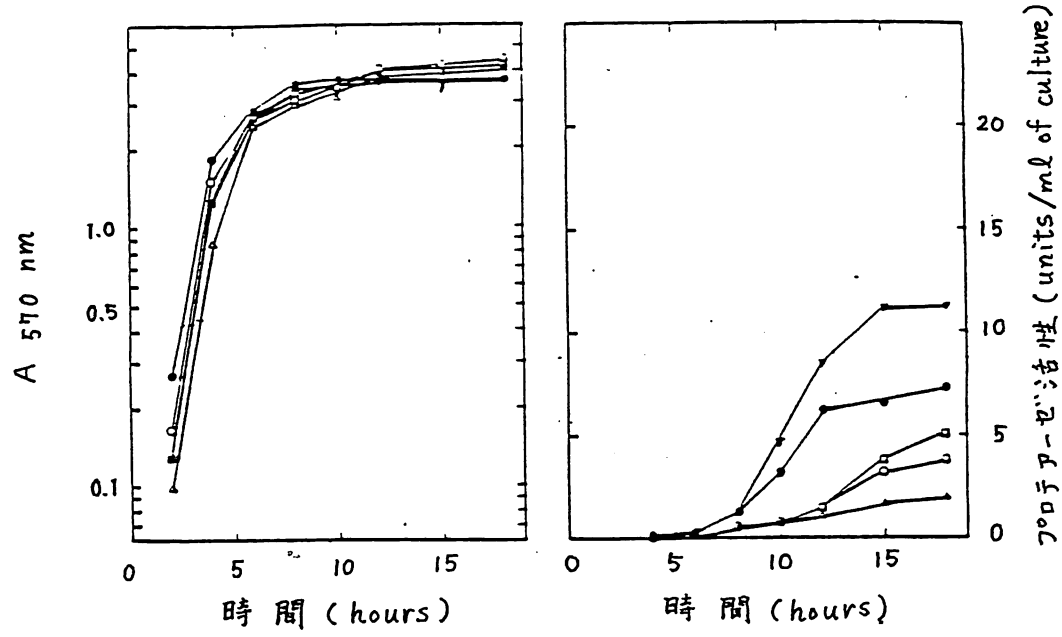

図1-6。　<u>rgn</u>突然変異体のプロテアーゼ生産性。試験菌を37°CでNB培地で振盪培養した。酵素活性は粗酵素液として培養ろ液を用い時間の関数として表わした。菌株および記号：○，親株（YS11）；●，<u>rgn</u>-1変異体（AG-5）；▼，<u>rgn</u>-2変異体（AH-6）；□，<u>rgn</u>-3変異体（AH-8）；△，<u>rgn</u>-4変異体（AA-7）。

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い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、のプロトプラスト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トの生存を促進した（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）。プロトプラスト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、プロトプラストは膨潤し、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ことは稀れであった。血液増補剤無添加の液体培地中では、プロトプラストは膨潤するだけであった。以上の結果は、血液増補剤は、プロトプラストの生育を促進し、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%前後になると考えると、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-ペナァセイ緩衝液中 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と子牛血清）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* YS11 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 YS11 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 ファ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 ファージに耐性、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し影響を及ぼす。

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、φ29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い出したため。

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1ℓ当り30g 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。ポリビニルピロリドン、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。これらのうち、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（PBS1 ファージに耐性、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 はポリビニルピ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化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0.1μg DNA以下でも飽和することがあり、1μg 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 と 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化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* IFO12110[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* MI112[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[54]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 $r_K^-m_K^-$ (*thr*, *leu*, *thi*, *gal*, *hsdM*, *hsdR*)[55]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		
B. subtilis		
1685	trpC2, strA	第1章
YS11	purB6, arg-15, leuB8	第1章
LMHA	purA16, hisA3, leuA8, metB5	第1章
RM125	arg-15, leuB8, $r_M^- m_M^-$	別府 輝彦 教授
MI112	thr-5, arg-15, leuB8, recE4 $r_M^- m_M^-$	関 達治 博士
B. amyloliquefaciens		
23843	wild-type	関 達治 博士
B. licheniformis		
FD0120	met-1, pepA1	関 達治 博士
B. megaterium		
IAM1030	wild-type	関 達治 博士
FM4	ilv-1, arg-1	IAM1030 より NTG処理して得た Ilv^-Arg^- 突然変異体
B. pumilus		
IFO12110	wild-type	関 達治 博士
E. coli		
C600 $r_K^- m_K^-$	thr, leu, thi, gal, hsdR, hsdM	関 達治 博士
HB101	pro, leu, thi, lac, rpsL hsdR, hsdM, recA, endoI	関 達治 博士 (60)
プラスミド		
pTP4	cam	河野 恵 教授
pJKK310[a]	kan, amp, tet	岡田 弘輔教授
pJKK523[b]	cam, amp, tet	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、別府輝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 μg/ml もしくは 25 μg/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 μg/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 μg/ml、HCP 培地には 100 μg/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 μg/ml と 40 μg/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。抗生物質を含む 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（$A_{570\,nm}$ = 0.8）まで振盪培養する。E. coli C600 $r_K^-m_K^-$（pJKK523）および E. coli C600 $r_K^-m_K^-$（pJKK310）の場合には、最終濃度が 170 μg/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×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，pH 8.0）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。沈澱にTE緩衝液を加え溶解させ、最終濃度で200μg/ml となるように RNase A の溶液（20mg/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澱し、DNA をTE緩衝液にとかす。その4.76mlに塩化セシウム 5g、4.6mg/ml 臭化エチジウム 0.5ml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澱により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 0.5 ml 培養液を 1.5 ml 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 100 μl 溶液1 〔2 mg/ml リゾチーム-50 mM グルコース-10 mM シクロヘキサンジアミンテトラ酢酸 (CDTA)-25 mM トリス塩酸, pH 8.0〕を加え、懸濁し、0°C 30分後、200 μl 溶液2 (0.2N NaOH-1% SDS) を加えゆるやかに撹拌する。0°C 5分後 150 μl 溶液3 (3M 酢酸ナトリウム, pH 4.8) を加え、撹拌後、0°C 60分保つ。10,000 × g, 5分遠心分離し、上澄み液 400 μl に 1000 μl のエチルアルコール (-40°C) を加え 30 分保つ。10,000 × g, 2分遠心分離し沈澱を 100 μl 溶液4 (0.1M 酢酸ナトリウム-0.05M トリス塩酸, pH 8.0) 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、前述のごとく沈澱を集め 20 μl TE 緩衝液に懸濁する。

プラスミドDNAによる形質転換　ポリエチレングリコール (PEG) で誘導したプロトプラスト形質転換は、Chang と Cohen[9] の方法を基本として行った。第1章第2節で述べた方法で得たプロトプラスト懸濁液 1 ml に、プラスミドDNA溶液 0.1 ml と 2× SMM 0.1 ml を加え、ゆるやかに撹拌後 0°C 2分保ち、10 ml SMM を加え撹拌し、4,000 × g, 10分遠心分離する。沈澱したプロトプラスト

区分に1mlのHCP-3またはHCP-3+ade培地を加え、30°C 1.5時間保温し、抗生物質耐性の発現を促し、選択培地（HCP-3を基本とした抗生物質含有培地）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　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40mMトリス塩酸，pH7.9-1mM EDTA，pH7.7-5mM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10μl-20μl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、7V/cmの定電圧で9時間もしくは12V/cm，4時間電気泳動した。DNAの染色は最終濃度で0.5μg/mlの臭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-vve® transilluminator model C62（Ultra-Violet Products, Inc.）下で調べた。ゲルの写真はコダック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ー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. プラスミド形質転換の条件　*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* YS11を種々の時間リゾチ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チーム15分処理の後、ほぼ一定の値を示した。一方、形質転換頻度（再生体数当りの形質転換体）は、リゾチーム処理45分まで増加し、最大20%の頻度を示した。*B. subtilis* YS11プロトプラストの再生頻度は30分リゾチーム処理により10^{-2}まで減少し、その後ほぼ一定となる。以上の結果は、45分リゾチーム処理で得られるプロトプラストは、15分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以下で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プラスミド分子当り1個のCm^r

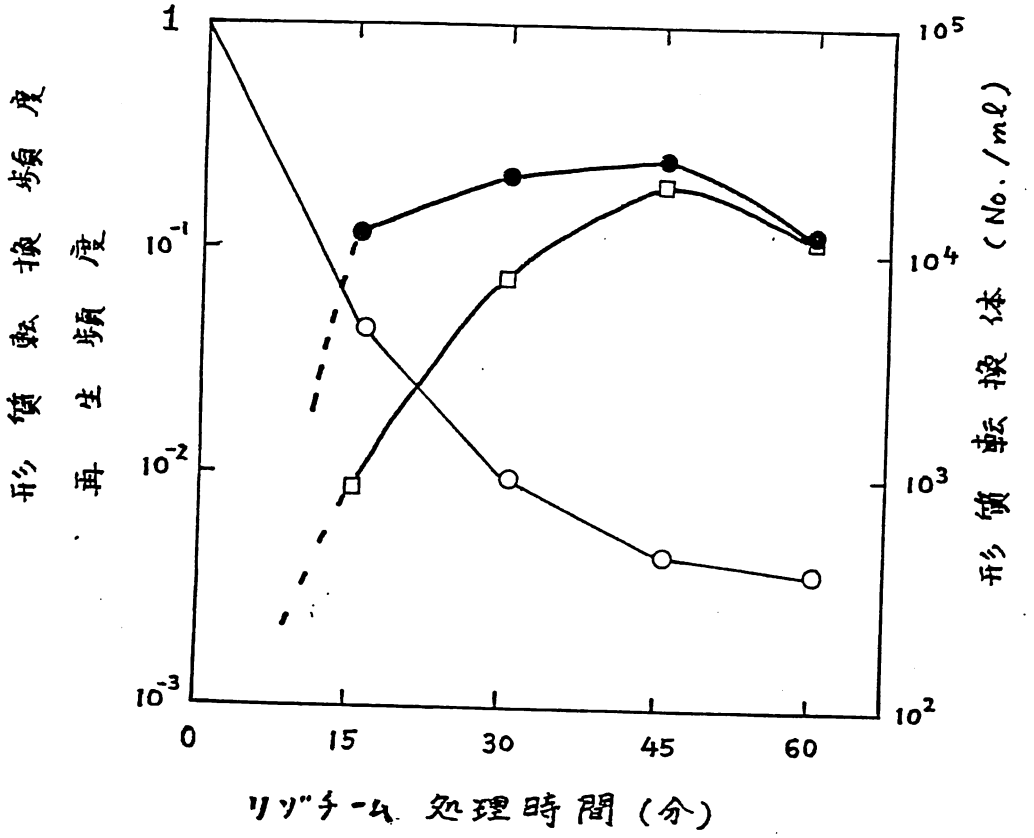

図2-1. プロトプラスト形質転換と再生の時間経過.

B. subtilis YS11の対数増殖期細胞を250μg/mlリゾチーム溶液中で42°C 15, 30, 45および60分保温した。各々から調製した試料にプラスミドpTP4 DNA溶液（最終濃度0.36μg/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（12.5μg/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），■.

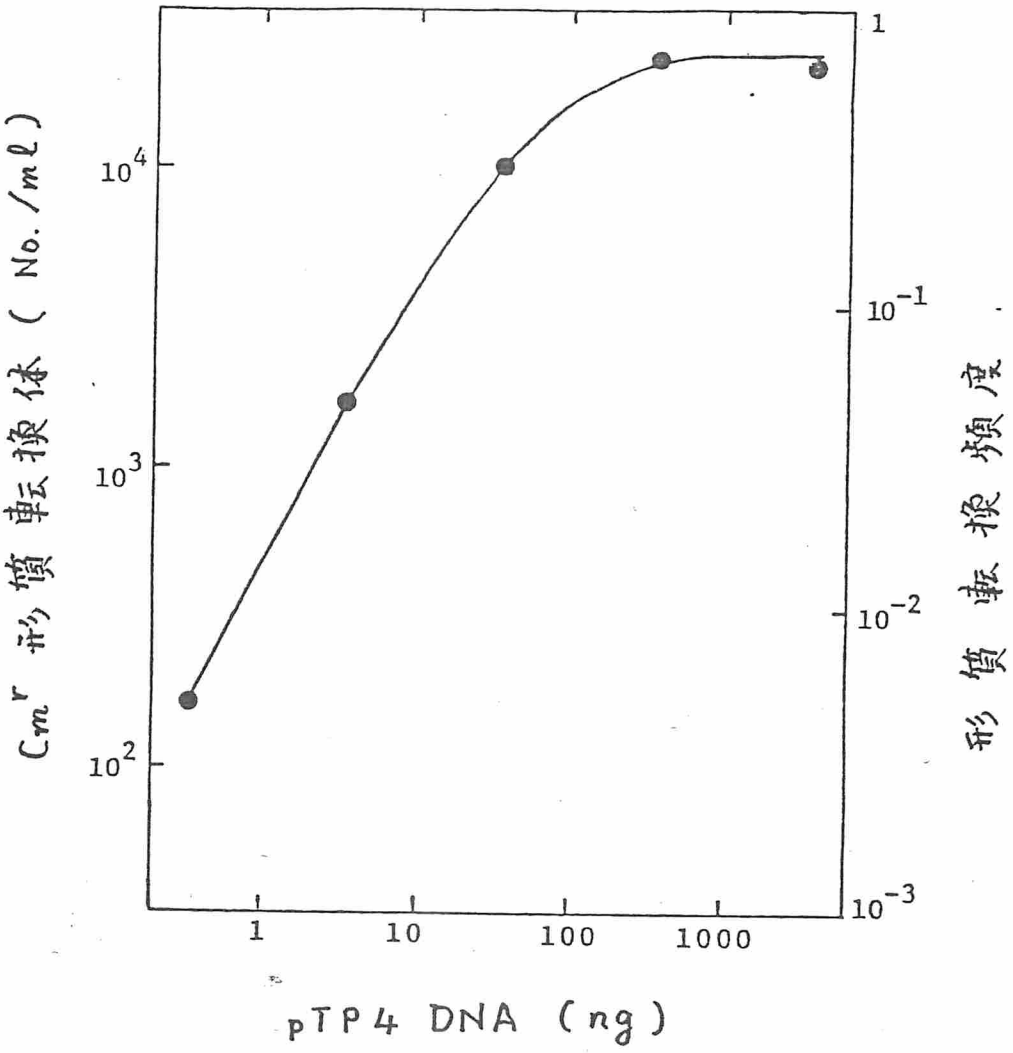

図2-2. B. subtilis YS11 の pTP4 DNA によるプラスミド形質転換の効率と頻度. 形質転換溶液の mℓ 当りの再生体数は 3.4×10^4 である。プラスミドDNA溶液 (0.1mℓ) と 2×SMM (0.1mℓ) との混合液を 1mℓ のプロトプラスト懸濁液に加え、続いて 3mℓ の PEG溶液を加え、0°C 2分後遠心分離し、実験材料と実験方法に述べたように Cm^r 形質転換体数を調べた。

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*属におけるプラスミドDNAによるプロトプラスト形質転換　*B. subtilis* YS11、*B. amyloliquefaciens* 23843、*B. licheniformis* FD0120、*B. megaterium* IAM1030 および *B. pumilus* IFO12110 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* IFO12110 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
B. subtilis YS11	1.5×10^7	3.4×10^4	2.4×10^4	7.1×10^{-1}
B. amyloliquefaciens 23843	1.0×10^7	6.2×10^4	8.2×10^2	1.3×10^{-2}
B. licheniformis FD0120	6.2×10^8	6.7×10^4	1.5×10^3	2.2×10^{-2}
B. megaterium IAM1030	2.5×10^7	2.5×10^3	2.3×10^2	9.2×10^{-2}
B. pumilus IFO12110	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 μg/ml でその 0.1ml と 2×SMM 0.1 ml 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 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、*E. coli* プラスミド pBR322 と pTP4プラスミド

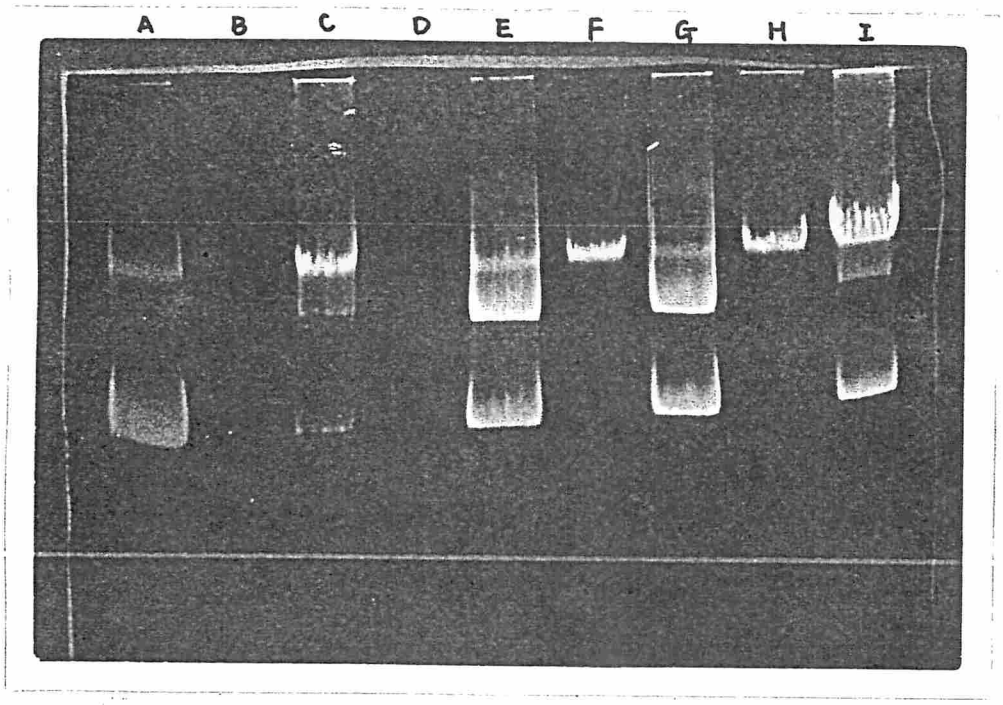

図2-3. Bacillus 属プロトプラストのpTP4 DNAによる形質転換で得られたCm^{r}形質転換体より調製した上清溶菌液の1.4%アガロースゲル電気泳動像。 A, B. subtilis LMHA (pTP4); B, B. licheniformis FD0120; C, B. licheniformis FD0120 (pTP4); D, B. pumilus IF012110; E, B. pumilus IF012110 (pTP4); F, B. megaterium IAM1030; G, B. megaterium IAM1030 (pTP4); H, B. amyloliquefaciens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

を EcoRI 処理し、T4 DNA リガーゼ処理後、$CaCl_2$ 処理した E. coli C600 $r_K^- m_K^-$ コンピテント細胞に加え、$Tc^r Ap^r Cm^r$ 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) の雑種プラスミドを DNA 供与体とし $CaCl_2$ 処理した E. coli C600 $r_K^- m_K^-$ 細胞および B. subtilis MI112 (thr-5、leuB8、arg-15、recE4、r_M^- m_M^-) プロトプラ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 $r_K^- m_K^-$ 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 の雑種プラスミドから 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 との雑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 pJKK310 (pBR325 + pUB110)、pJKK523 (pBR322 + pC221) を用いて B. subtilis プロトプラスト形質転換を調べた。B. subtilis RM125 (arg-15、leuB8、r_M^- m_M^-)、B. subtilis MI112 (thr-5、leuB8、arg-15、r_M^- m_M^-、recE4) および B. subtilis 168S (trpC2、strA) プロトプラストに pJKK310 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った（図2-4）。RM125、MI112およびI68Sプロトプラストのp JKK523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 $r_K^- m_K^-$（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すことができなかった。

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、$r_M^- m_M^-$および recE遺伝子は上記現象と無関係であること（$r_M^+ m_M^+$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（trp C2、strA）の遺伝背景は上記雑種プラス

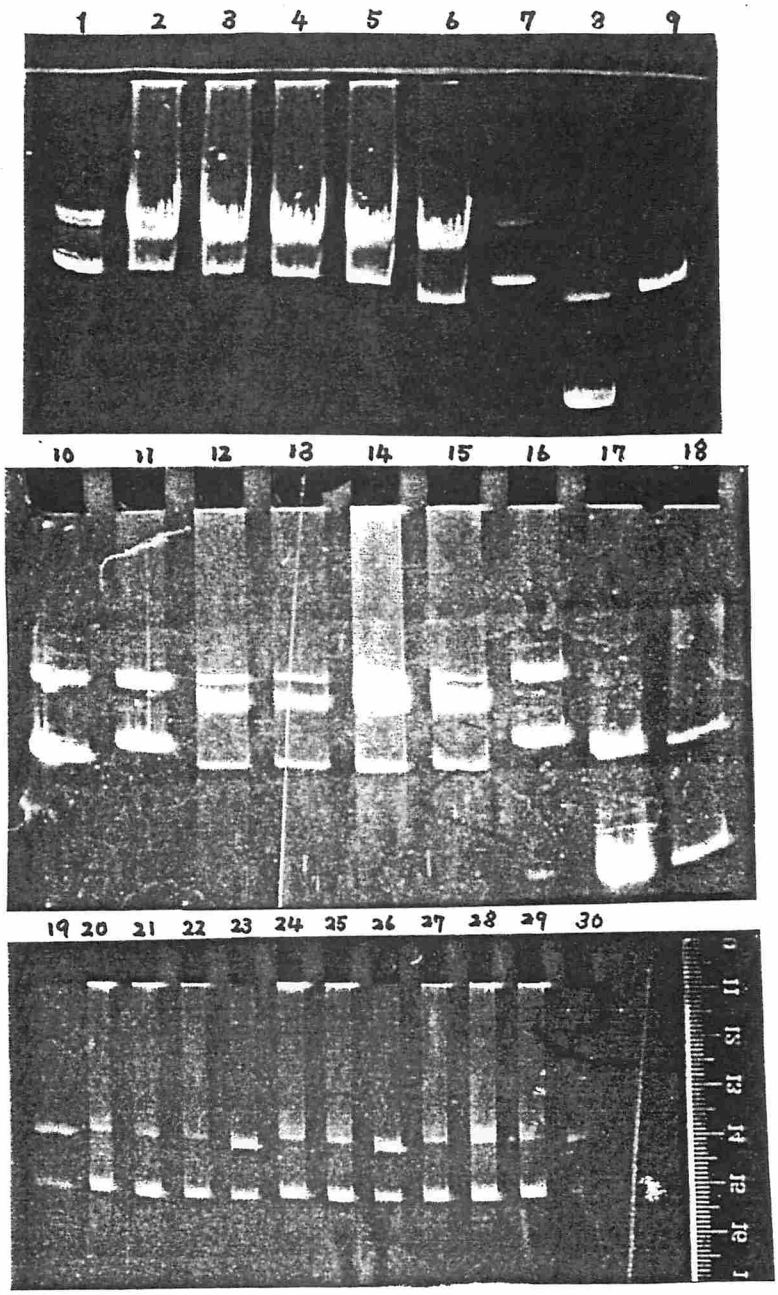

図2-4. pJKK310 DNAによる *B. subtilis* RM125、MI112および168SのKm^{r}形質転換体中で見い出されるプラスミドDNAの1.4%アガロースゲル電気泳動。 1, 7, 11, 16, 19, 23, 26と30, pJKK310 DNA; 2-6, RM125のKm^{r}形質転換体よりの上清溶菌液; 8, 17と18, pBR322 DNA; 9と10, pJKK523 DNA; 12-15, MI112のKm^{r}形質転換体よりの上清溶菌液; 20-22, 24, 25と27-29, 168SのKm^{r}形質転換体よりの上清溶菌液。

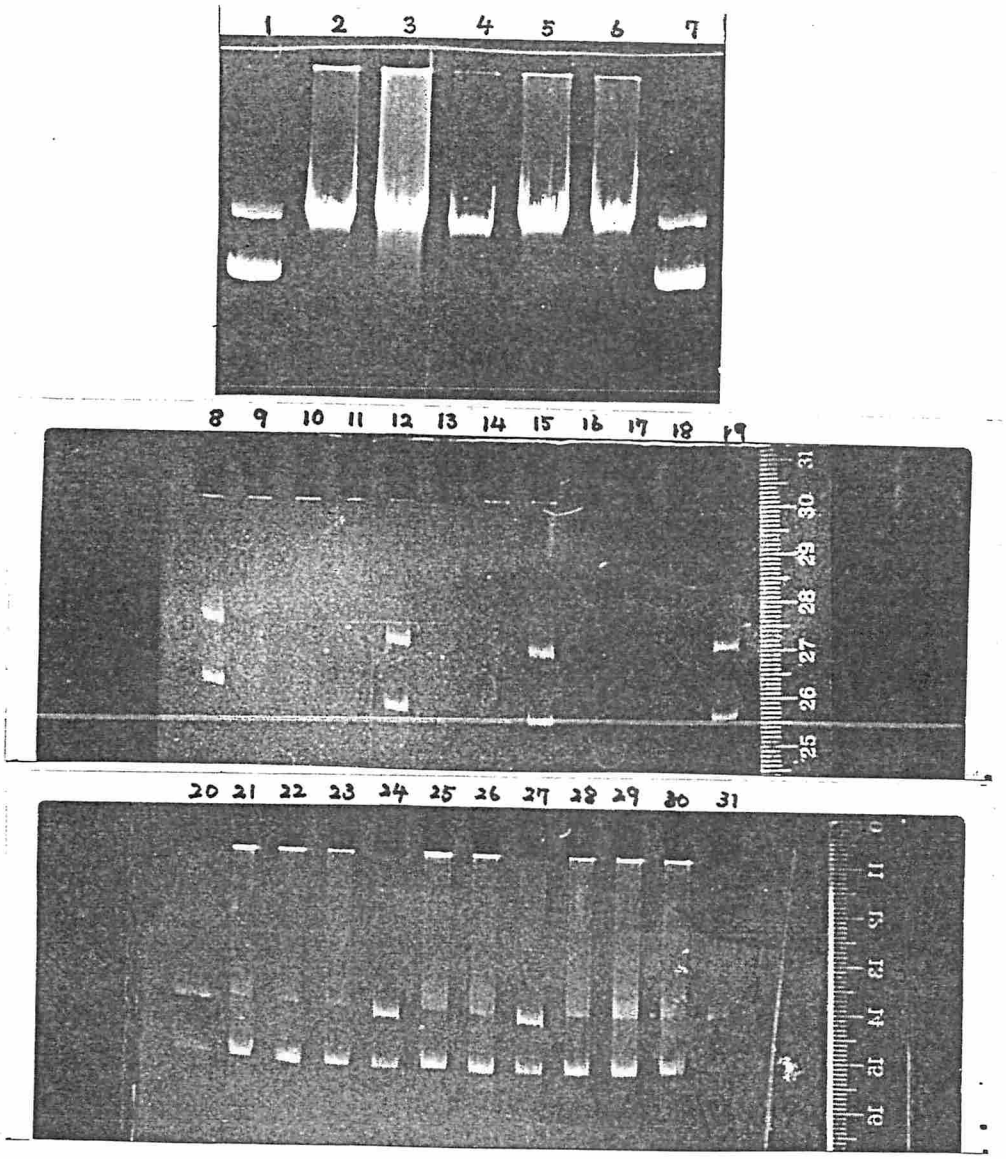

図2-5. pJKK523プラスミドDNAによる *B. subtilis* RM125、MI112および168SのCm^r形質転換体より得られる上清溶菌液の1.4%アガロースゲル電気泳動像。 1, 7, 8, 12, 15, 19, 20, 24, 27と31, pJKK523 DNA; 2-6, RM125のCm^r形質転換体より得られる上清溶菌液; 9-11, 13, 14と16-18, MI112のCm^r形質転換体より得られる上清溶菌液; 21-23, 25, 26と28-30, 168SのCm^r形質転換体より得られる上清溶菌液。

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、YS11 および LMHA）より、リゾチ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分とリゾチ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個と増加した（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分リゾチーム処理した 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 Ap^r Tc^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 Ap^r Tc^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 プラスミドDNAによる形質転換頻度

受容菌	リゾチーム処理の時間（分）	選択符号	Km^r 形質転換体数 / μg 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
YS11	45	Km^r	2.8×10^5
LMHA	45	Km^r	4.2×10^5

で調べたところ pJKK310 の欠失プラスミドを有していた。これらのことは、15分間リゾチーム処理した 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を示している（表2-4）。欠失プラスミドが出現する頻度は、リゾチ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分リゾチーム

表2-4. *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ (pJKK310) より得た pJKK310 DNA による4個の *B. subtilis* 株 (168S、YS11、LMHA、および RM125) と *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ の Km^r 形質転換体コロニーの解析[a]

pJKK310 の由来菌	リゾチーム処理時間 (分)	選択符号	*E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ 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^rTc^r	Ap^rTc^s	Ap^rTc^r と Ap^rTc^s
B. subtilis						
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
YS11	45	Km^r	4	0	2	2
LMHA	45	Km^r	8	5	0	3
E. coli						
C600 $r_K^- m_K^-$		Km^r	10	0	0	0

a. 種々の *B. subtilis* (pJKK310) および *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ (pJKK310) より調製した上清溶菌液 (pJKK310) による *E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$ 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 $r_K^- m_K^-$ 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 クローンと 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における挿入不活化ベクターの作製

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に耐性であるので調べることができない。〔B. subtilis 168SとB. subtilis 168S (pJKK 310)は、ともにテトラサイクリン5μg/mlおよび10μg/mlを含むNA培地上で増殖し、15μg/mlおよび20μg/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、1μg/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pJKK 310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1μg/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 $r_k^- m_k^-$ 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 より分子量のふきなプラスミドを見い出した。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、BamH1、EcoR1、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、EcoR1 および BamH1 で1ケ所切断される。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 EcoR1 部位と

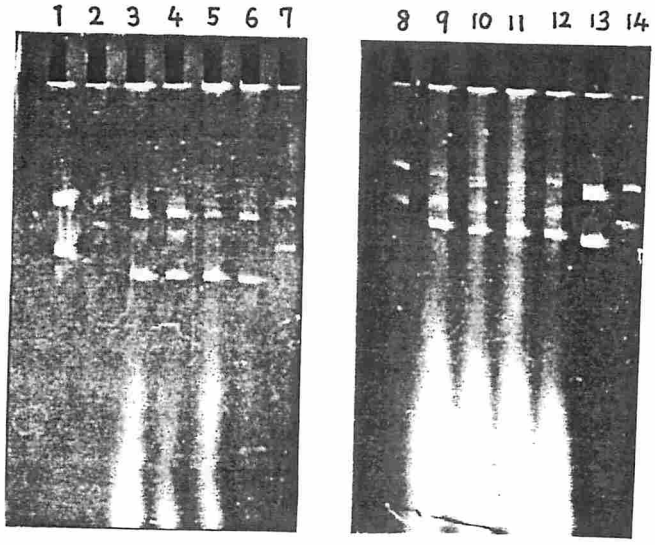

図2-7. pAC1 および pAC2 プラスミド DNA の 1.4% アガロースゲル電気泳動。 1と13, pJKK523 DNA; 2, 7, 8と14, pJKK310 DNA; 3-6, B. subtilis AC28 (pAC1) よりの pAC1 DNA; 9-12, B. subtilis AC28 (pAC2) よりの pAC2 DNA。

pUB110 領域の BamHI を含む約2.3 Kb と考えられる。一方、pAC2 では EcoRI, HindIII で1ケ所、BamHI で2ケ所切断されること、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 EcoRI 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 株 (ilu-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

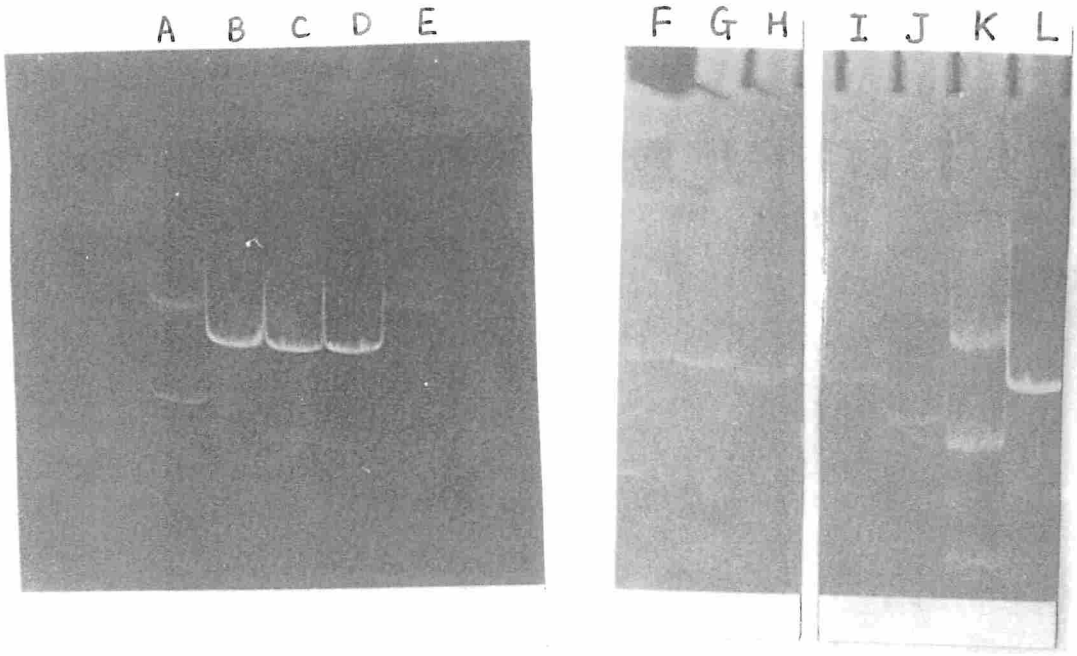

図2-8。 pAC1 および pAC2 プラスミドの制限酵素切断パターンの解析。 A, E および K, pAC1; B-D, および L, pAC1: B, BamH1 処理、C, EcoR1 処理、D および L, Hind III 処理; J, pAC2; F-I, pAC2: F, Hind III 処理、G, EcoR1 処理; H および I, BamH1 処理。

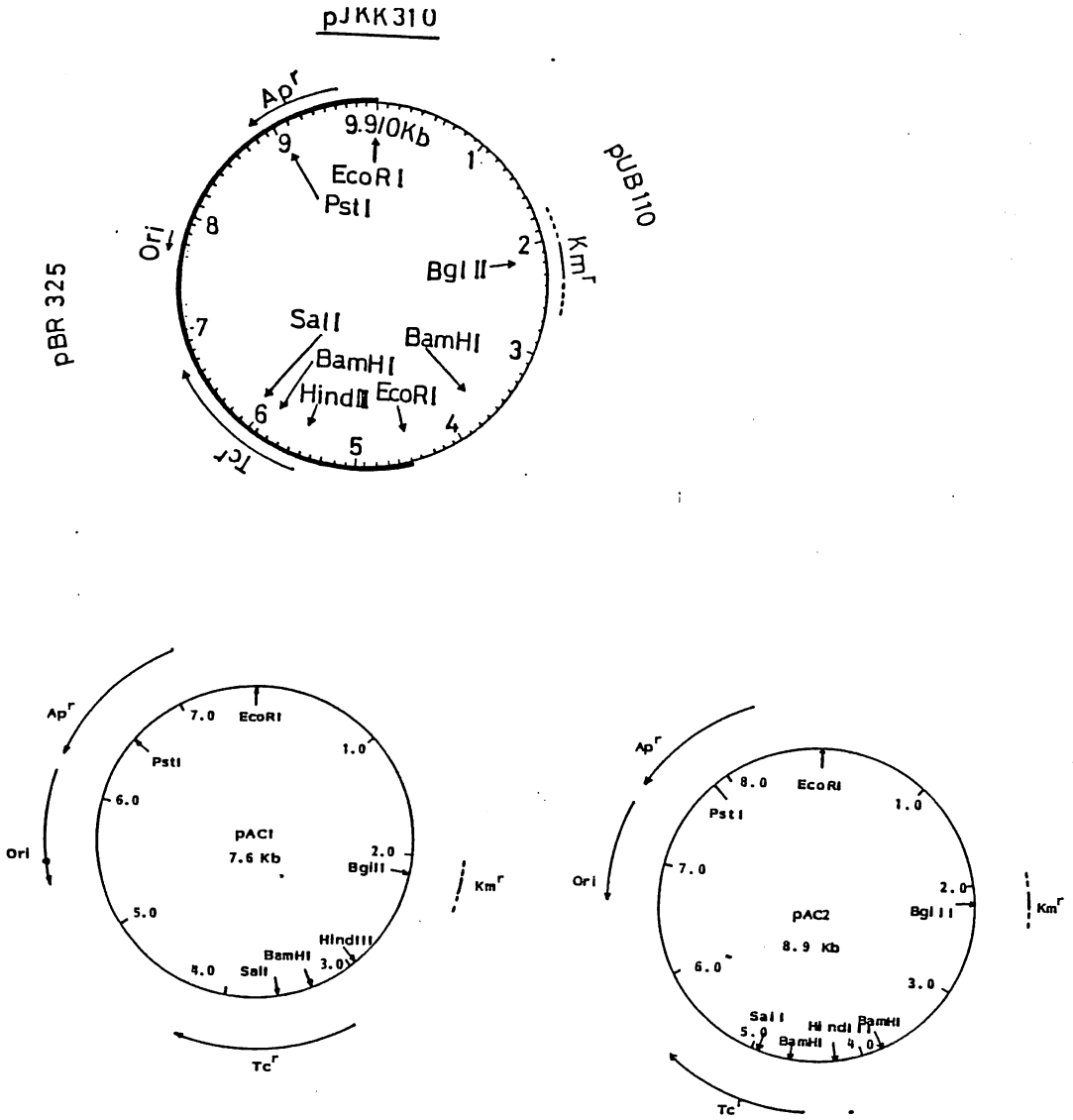

図2-9. pJKK310, pACI および pAC2 の制限地図.
pJKK310 の制限酵素地図は太円で表わした pBR325[58] と細円で表わした pUB110[59] の制限酵素地図をあわせた地図である。円外の Ori 記号は E. coli pBR325 プラスミドの複製起点である。

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（HindⅢ、SalⅠ，BamHI）、Ap（PstⅠ）(65-68)、および Km（BglⅡ）遺伝子の挿入不活化標識として使用できるので有用なベクターである。

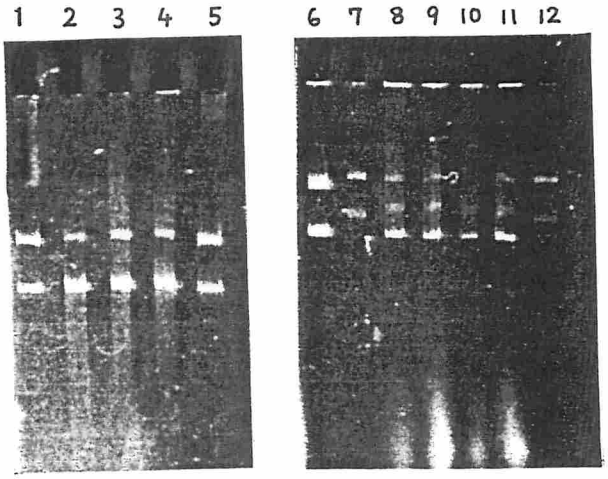

図 2-10。　プラスミド DNA の 1.4% アガロース電気泳動。1 と 5，*B. subtilis* AC 28 より調製した pAC1；2-4，*B. megaterium* FM4 より調製した pAC1；6，pJKK523；7 と 12，pJKK310；8，*B. subtilis* AC28 より調製した pAC2；9-11，*B. megaterium* FM4 より調製した pAC2。

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、[54] 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。そ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。すなわち、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$Ap^r Tc^r Cm^r$プラスミド（pJKK523）[53]とpBR325とpUB110から成る$Ap^r Tc^r Km^r$プラスミド（pJKK310）[53]による*B. subtilis*プロトプラストの形質転換を調べたとき、pJKK523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った。すなわち、pJKK523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、pJKK310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っ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）。

pJKK310は、*E. coli* C600 $r_K^- m_K^-$内で$Ap^r Tc^r Km^r$の表現型を与える。*B. subtilis* AC28のpJKK310 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いにより*tet*遺伝子の読み取りが異なるとは考えにくい。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pJKK310とは異なり今回用いたpJKK310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 pJKK310 DNA による形質転換で観察したような pJKK310 と欠失 pJKK310 の混合から成る菌株であり、かつ欠失 pJKK310 は pAC1 や pAC2 のようなタイプであるという考え方である。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ミ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、tet 遺伝子が B. subtilis 内で発現するという誤まった結論が引き出されるであろう。

第5節 要約

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 属の細菌のプラスミド 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ミドを保有していた。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

グベクタープラスミドとして有用である。挿入不活化ベクターとしてpJKK310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 と Hotchkiss[2] 並びに Fodor と Alfördi[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[4]、Brevibacterium[6]、Providence alcalifaciens[7]、staphylococci[8] 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章で見い出した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* YS11 DNA（*purB*6、*arg*-15、*leuB*8）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（*purA*16、*leuA*8、*metB*5、*hisA*3）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PBS1ファージ形質導入より *cysA*14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カザミノ酸の代わりに20mgカザミノ酸、1gクエン酸ナトリウム、2g $(NH_4)_2SO_4$ 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（HC*P-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
B. subtilis		
168S	trpC2、strA	第1章
168SA	trpC2、strA、purA	168Sのpur A変異体
1-18	hisH2、	*a (18)
YS 11	purB6、arg-15、leuB8	第1章
LMHA	purA16、leuA8、metB5、hisA3	第1章
LMHA (pTP4)	purA16、leuA8、metB5、hisA3、Cm^r	第2章、河野恵教授
B. amyloliquefaciens		
F	arg、his	* (18)
B. licheniformis		
ATCC9945A	wild-type	* (18)
12107T	thr	ATCC9945Aのthr変異体
FD0120	met-1、pepA1	* 第2章
FD0250	his-6、pepA1	* (18)
HM	his-6、pepA1、met	FD0250よりのmet変異体
B. megaterium		
IAM1030	wild-type	* 第2章
FM4	ilv-1、arg-1	IAM1030よりのilv arg変異体
FM27	gly-1	IAM1030よりのgly変異体
FM7	met-1、trp-1	IAM1030よりのmet trp変異体
FM9	ilv-2、thr-1	IAM1030よりのilv thr変異体
A	arg-2	IAM1030よりのarg変異体
FMS2-1	met-1	FM7×FM27細胞融合組換え体
FMS2-9	trp-1	FM7×FM27細胞融合組換え体
B. pumilus		
IFO12110	wild-type	* 第2章

a. 関　達治博士より分譲

プロトプラスト融合　　プロトプラスト融合法は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<u>Bacillus</u>属菌株のプロトプラスト懸濁液を混ぜ4,000×g、10分間遠心分離し0.2mlのサッカロース-マレイン酸緩衝液（SMM）に懸濁した。1.8mlのポリエチレングリコール溶液［100mlのSMM中に40gのポリエチレングリコール（PEG4000、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分間保った後、適当に希釈し、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ゾチーム処理時間の関係を<u>B. subtilis</u> YS11（<u>purB</u>6、<u>leuB</u>8、<u>arg</u>-15）と<u>B. subtilis</u> LMHA（<u>purA</u>16、

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}）しか得られなかった。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（4.5×10^{-3}－9.9×10^{-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 (交雑)	選択符号	再生頻度	融合頻度[b] 細胞融合体 初発菌体	融合頻度[b] 細胞融合体 最少の再生体
B. licheniformis				
12107T	*thr*	2.2×10^{-3}		
FD0120	*met*-1、*pepA*1	9.9×10^{-4}		
FD0250	*his*-6、*pepA*1	1.8×10^{-3}		
(12107T × FD0120)	$Thr^+ Met^+$		2.5×10^{-5}	9.9×10^{-2}
(FD0120 × FD0250)	$Met^+ His^+$		6.6×10^{-6}	1.1×10^{-2}
(12107T × FD0250)	$Thr^+ His^+$		8.8×10^{-6}	2.9×10^{-2}
B. subtilis				
1-18	*hisH*2	2.5×10^{-2}		
168S	*trpc*2、*strA*	3.4×10^{-2}		
168SA	*trpc*2、*strA*、*purA*	1.8×10^{-3}		
(1-18 × 168S)	$His^+ Trp^+$		2.4×10^{-5}	4.5×10^{-3}
(1-18 × 168SA)	$His^+ Ade^+$		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分ポリエチレングリコール処理し、その懸濁液を希釈し、HC*P-3 寒天培地上にまたは L-トリプトファンを欠く HC*P-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[37]初発菌体数（両菌体の生菌数の合計）に基づいて表わした。さらにポリエチ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 Trp^- Str^s、Trp^+ Str^s、Trp^- Str^r および Trp^+ 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（Trp^+/ Trp^+ + 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 間の強い連関を意味する。また purA と strA 間の組換え頻度（Str^r/Str^r+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、PBS1ファージで検出できるような弱い連鎖で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）の掛け合わせより得られた Gly^+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 Gly^+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 間でも連関を認めた。

表 3-3。 *B. megaterium* 同種内細胞融合による *ilv*-1 と *arg*-1、*ilv*-2 と *thr*-1、および *gly*-1 と *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	組換え体 数
FM4 (*ilv*-1、*arg*-1)	× FM27 (*gly*-1)	Gly^+ Arg^+	Ilv^+	164
			Ilv^-	8
			計	172
		Gly^+ Ilv^+	Arg^+	110
			Arg^-	15
			計	125
FM4 (*ilv*-1、*arg*-1)	× FMS2-1 (*met*-1)	Met^+ Ilv^+	Arg^+	45
			Arg^-	2
			計	47
		Met^+ Arg^-	Ilv^+	170
			Ilv^-	1
			計	171
FM4 (*ilv*-1、*arg*-1)	× FMS2-9 (*trp*-1)	Trp^+ Ilv^+	Arg^+	89
			Arg^-	4
			計	93
		Trp^+ Arg^+	Ilv^+	158
			Ilv^-	2
			計	160
FM7 (*met*-1、*trp*-1)	× FM27 (*gly*-1)	Gly^+ Met^+	Trp^+	4
			Trp^-	38
			計	42
		Gly^+ Trp^+	Met^+	252
			Met^-	75
			計	327
FM9 (*ilv*-2、*thr*-1)	× FMS2-1 (*met*-1)	Met^+ Thr^+	Ilv^+	45
			Ilv^-	11
			計	56
		Met^+ Ilv^+	Thr^+	40
			Thr^-	3
			計	43
FM9 (*ilv*-2、*thr*-1)	× FMS2-9 (*trp*-1)	Trp^+ Ilv^+	Thr^+	37
			Thr^-	2
			計	39

3、異種間細胞融合によるプラスミドの移入　*B. subtilis* LMHA (pTP4) と *Bacillus* 属（*B. amyloliquefaciens* F、*B. licheniformis* FD0120、*B. megaterium* IAM1030 および *B. pumilus* IFO12110）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対のプロトプラスト懸濁液をそれぞれ *B. subtilis* LMHA (pTP4) の増殖できない 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、プラス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* へプラスミド

表 3-4。 *Bacillus* 属における異種間細胞融合[a]

菌株〔交雑〕	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	融合頻度[b] Ade$^+$Cm^{r}細胞融合体 最少再生体
1. *B. amyloliquefaciens* F	1.7×10^8	1.2×10^{-3}		
2. *B. subtilis* LMHA(pTP4)	8.5×10^8	6.9×10^{-3}		
〔1 × 2〕			4.5×10^{-7}	2.3×10^{-3}
3. *B. licheniformis* FD0120	8.8×10^8	1.1×10^{-3}		
4. *B. subtilis* LMHA (pTP4)	3.3×10^8	6.1×10^{-3}		
〔3 × 4〕			1.5×10^{-5}	1.9×10^{-2}
5. *B. licheniformis* FD0250	8.1×10^8	1.6×10^{-3}		
6. *B. subtilis* LMHA(pTP4)	2.3×10^8	3.2×10^{-3}		
〔5 × 6〕			2.6×10^{-5}	3.8×10^{-2}
7. *B. megaterium* A	2.2×10^7	2.6×10^{-5}		
8. *B. subtilis* LMHA (pTP4)	2.5×10^8	4.5×10^{-3}		
〔7 × 8〕			1.0×10^{-6}	5.0×10^{-1}
9. *B. pumilus* IF012110	8.4×10^8	3.0×10^{-4}		
10. *B. subtilis* 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 IFO12110 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デオキシリボヌクレアーゼによって影響を受けなかった。

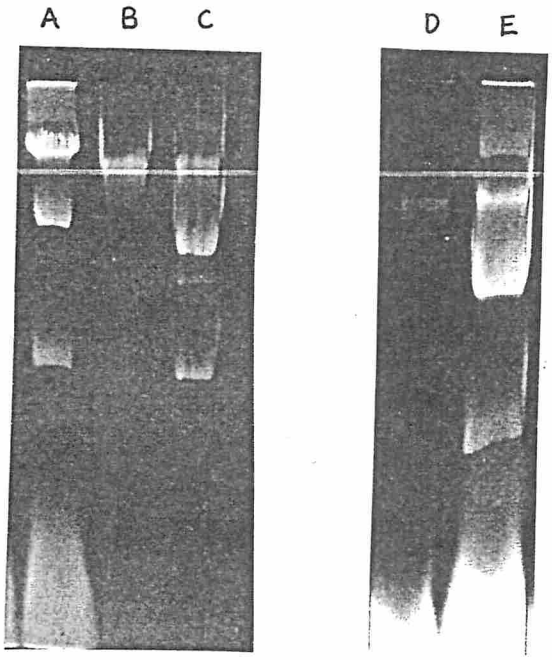

図3-1. B. subtilis LMHA (pTP4) と B. amyloliquefaciens F および B. licheniformis FD0120 との交雑よりの細胞融合体中で見い出されるプラスミド pTP4 のアガロースゲル電気泳動。 A, B. amyloliquefaciens F (pTP4); B, B. amyloliquefaciens F; C, 対照 (pTP4); D, B. licheniformis FD0120; E, B. licheniformis FD0120 (pTP4)。

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 4μg/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、purA16) 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 クローンは、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 YS11 (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* YS11（*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	融合頻度 融合体		示した非選択符号を持つ数					
	初発菌体	最少再生体	purA	arg	his	leu	met	No.
Leu^+Met^+	2.6×10^{-8}	7.0×10^{-5}	+	−	+			1
			−	−	+			2[b]
Arg^+Met^+	1.3×10^{-7}	3.5×10^{-4}	+		+	+		1
			+		+	−		1
			+		−	−		1
Ade^+Met^+	2.4×10^{-7}	6.5×10^{-4}		+	+	+		2
				+	+	−		2
				−	+	−		2[b]
				−	+	+		1
Leu^+His^+	2.2×10^{-7}	6.0×10^{-4}	+	+			+	3
Ade^+His^+	2.9×10^{-7}	8.0×10^{-4}		−		−	+	1
				+		−	−	1
				−		−	−	1
				−		+	+	1
Arg^+His^+	−[c]	−[c]						

a. *B. subtilis* YS11 および *B. licheniformis* HM の ml 当りの生菌数はそれぞれ 8.4×10^8 と 9.0×10^8 個であった。YS11 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も表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。Henner と Hoch によって報告[73]されている B. subtilis 360° 染色体地図で ilv B、C と arg 間が 11°、gly A と trp E 間が 2.5°、ilv B、C と thr A 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 らによって報告された[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 らによって報告[75,76]された B. megaterium の普遍形質導入ファージ 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ファ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に近縁で7-36%の高い相同値が関ら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 trp C 遺伝子は B. licheniformis および B. pumilus の trpC 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い出した。B. subtilis YS11 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％子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ー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および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10gのポリビニルピロリドン (K90、平均分子量700,000 丸善化学薬品株式会社、京都) をそれぞれ含む。HMP-1.5培地は5gのカザミノ酸の代わりに2gの$(NH_4)_2SO_4$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. subtilis		
168S	trpC2、strA	第1章
YS11	purB6、arg-15、leuB8	第1章
LMHA	purA16、leuA8、hisA3 metB5	第1章
AC327	purB、his-1	168Sの誘導体
IA484	metC3、lyt-2	*a
AC333	purB、lyt-2	IA484 DNAによるAC327の His^+ Lyt^-形質転換体
AC343	purA、strA、metA、gltA、trpC2、leu-2 his-1	168Sの誘導体
AC370	aroD120、argA、leu-2 hisH2	168Sの誘導体。aroD120はQB935より由来
QB935	trpC2、aroD120、lys	関 達治 博士 (81)
B. amyloliquefaciens		
23843	wild-type	第2章
B. licheniformis		
FD0120	met-1、pepA1	第2章
FD0250	his-6、pepA1	第2章
B. megaterium		
IAM1030	wild-type	第2章
B. pumilus		
IFO12110	wild-type	第2章

*a. *Bacillus* Genetic Stock Center より分譲

ぞ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、4 mℓ 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 1 mℓ に懸濁し、30°C 3時間保温（プレインキュベート）する。10 mℓ 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、1.8 mℓ 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、4 mℓ 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、基本的に第2章第2節と同じである。プロト

プラストを1mlのSMMに懸濁し、0.1mlのプラスミドDNA溶液と0.1mlのSMMから成る溶液0.2mlを加える。0°C 2分後、10mlのSMMを加え、4,000×g、10分遠心分離し、プロトプラストをHCP-3 1mlで懸濁し、30°C 3時間保温した。抗生物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。プロトプラスト数の増加は、この間でほとんど認められなかった。保温したプロトプ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. プロトプラストの高頻度再生　対数増殖期の*B. subtilis* 168Sからリゾチーム処理して得たプロトプラストを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、プロトプラスト当り90%以上の非常に高い再生頻度が得られた（図4-1）。プ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倍再生が悪くなった（図4-1）。

図4-2にプ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

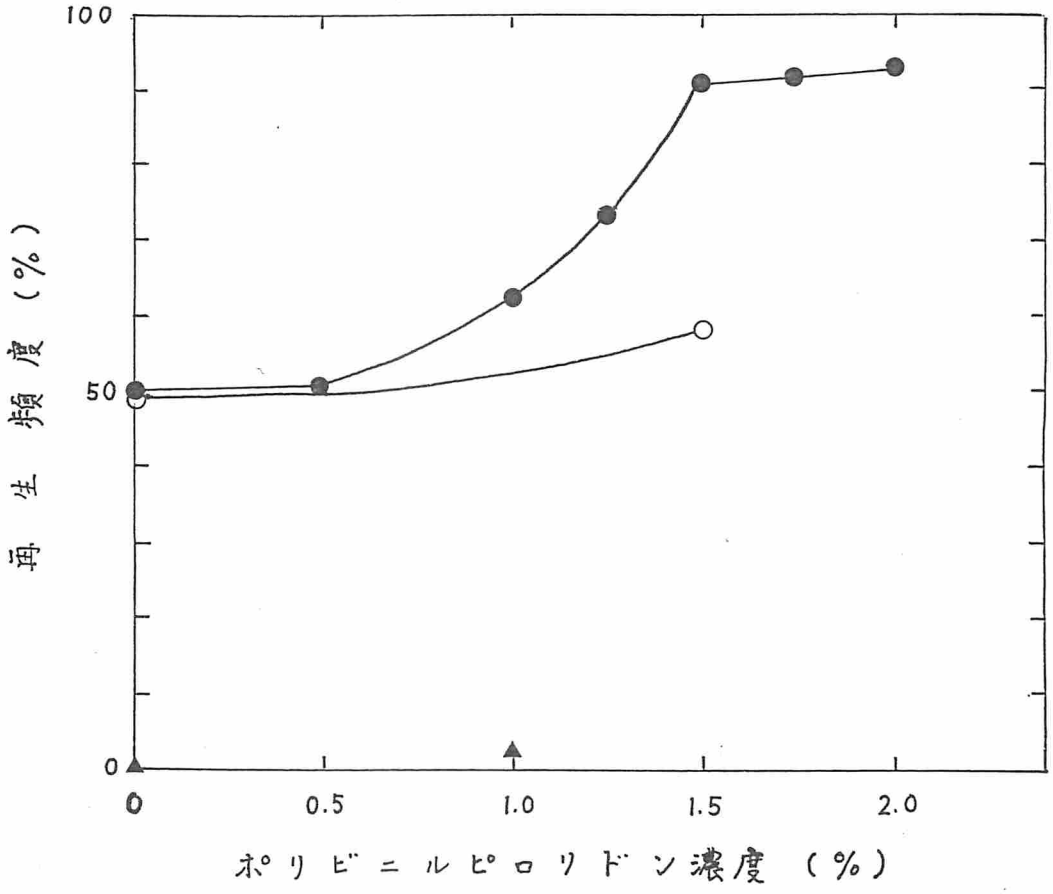

図4-1。 B. subtilis 168S プロトプラストの再生に及ぼす重層法とポリビニルピロリドン濃度の影響。 B. subtilis 168S プロトプラストを3つの部分にわけた。1部はHCP-3培地に懸濁し、30°C 3時間保温後、種々のポリビニルピロリドン濃度のHCP寒天培地に同上層培地で重層した。残りの2部はプロトプラストの保温なしにすぐにHCおよびHCP-1寒天培地に塗沫し、または重層した。再生培地上のコロニー数は30°C 4日後に計数した。 記号：▲，塗沫；●，重層，30°C 3時間保温；○，重層，保温なし。

ビニルピロリドンを含むHCP-5培地では、プ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、プ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プレインキュベートの顕著な促進効果を表4-2に示した。すなわち、トリプトファンを含むHMP-1.5寒天培地で、プ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50μg/ml L-トリプトファンを100μg/ml含むHMP-1.5寒天培地（HC*P-1.5寒天培地）でアミノ酸要求性株（トリプ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に示すようにプ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（50μg/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、

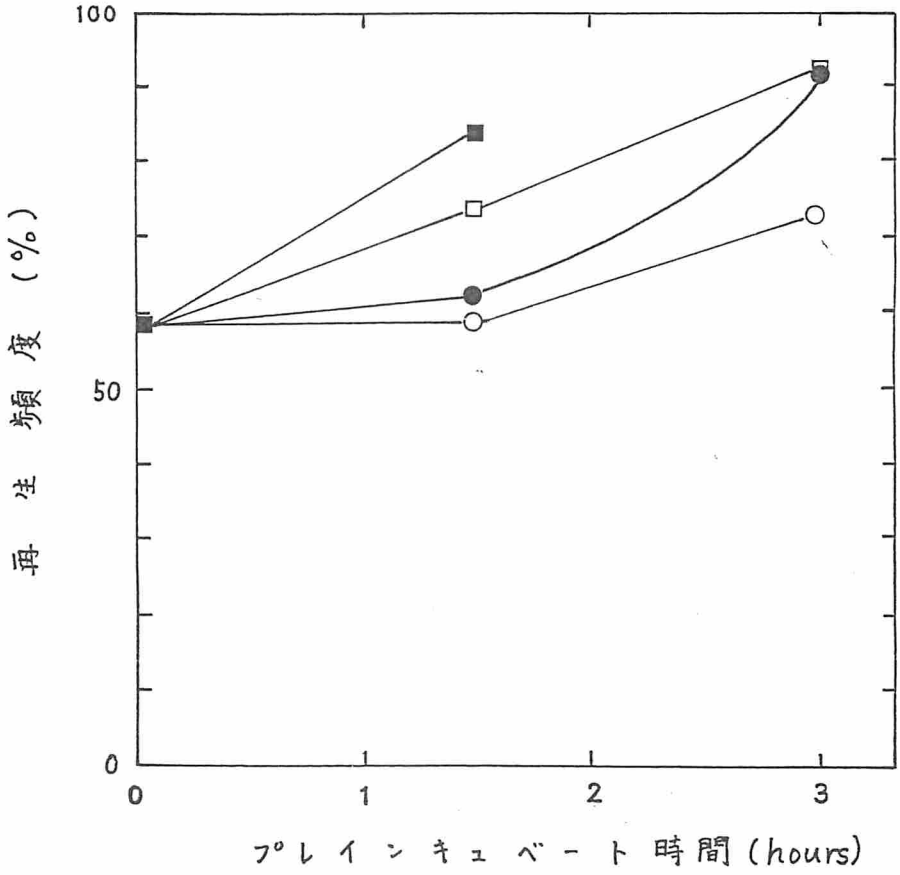

図4-2。　再生頻度に及ぼすポリビニルピロリドンの濃度とプレインキュベート時間の効果。　B. subtilis 168S プロトプラストを各種濃度のポリビニルピロリドンを含むHCP培地中で30°C 1.5時間あるいは3時間保温した。プレインキュベートしたプロトプラストの再生頻度はHCP-1.5寒天培地に重層することにより出現するコロニーを計数して求めた。　記号：○，1%ポリビニルピロリドン；●，2%；□，3%；■，5%。

表4-2。 プロトプラストの再生[a]に及ぼすプレインキュベートとカザミノ酸の効果

プレインキュベート時間 (hr.)	再生頻度 (%)		
	HMP-1.5 + L-トリプトファン	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 プロトプラストを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、50μg/ml カザミノ酸と100μg/ml L-トリプトファンを加えたHMP-1.5寒天培地である。

B. licheniformis FD0250、B. megaterium IAM1030 および B. pumilus IFO12110 より 42°C 45分リゾチーム処理してプロトプラストを調製し、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	再生頻度(%) 塗沫
B. subtilis 168S	2.6×10^8	92	2.0
B. amyloliquefaciens 23843	1.5×10^8	68	6.9×10^{-3}
B. licheniformis FD 0250	6.5×10^7	60	7.7×10^{-2}
FD 0120	2.5×10^8	0.8	6.4×10^{-3}
B. megaterium IAM 1030	1.7×10^8	13	1.2×10^{-2}
B. pumilus 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 (*purB*6、*arg*-15、*leuB*8) と *B. subtilis* LMHA (*purA*16、*metB*5、*hisA*3、*leuA*8) との間のプロトプラスト融合

を調べた。YS11 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 YS11 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い出した（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った。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（purA16、leuA8、hisA3、metB5）との間のプロトプラスト融合

菌株〔交雑〕	プロトプラストの希釈液	プロトプラスト（No./ml）	再生体（No./ml）	細胞融合体[a]（No./ml）
B. subtilis LMHA	SMM	7.6×10^7	5.7×10^7	
B. subtilis 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^+ 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 168S、B. amyloliquefaciens 23843、B. licheniformis FD0120、B. megaterium IAM1030 および B. pumilus IFO12110 からプロトプラストを調製し、pTP4 プラスミド DNA 0.1μg を加え、40%ポリエチレングリコール溶液を加え、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 168S で最も効率よく（1.3×10^7/μg 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)
B. subtilis 168S	8.8×10^7	1.3×10^7	1.3×10^6
B. amyloliquefaciens 23843	2.3×10^8	8.4×10^6	1.9×10^3
B. licheniformis FD0120	4.5×10^8	2.0×10^5	3.6×10^2
B. megaterium IAM1030	2.1×10^8	2.8×10^6	2.3×10^3
B. pumilus IFO12110	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 μg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法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DE間

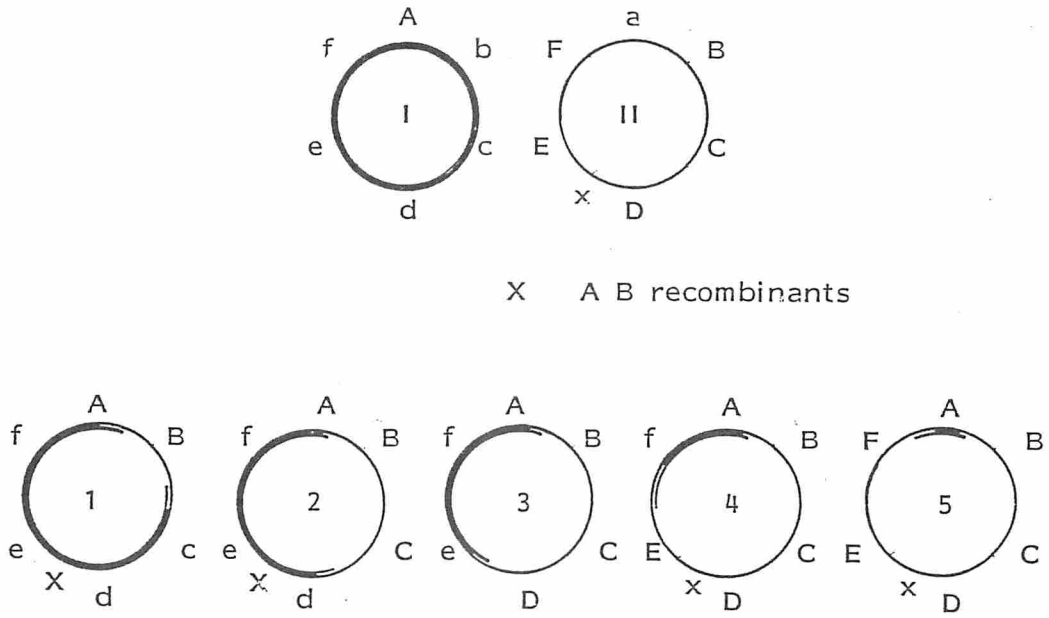

図4-3。 B. subtilis プロトプラスト融合による遺伝子座位決定法。 円はB. subtilisの染色体DNAを表わす。A, B, C, D, E, およびFはアミノ酸または核酸塩基合成に関する遺伝子を示し, xは座位未決定の遺伝子を示す。 太円は菌株Iの染色体DNA, 円内の線は交差部位を示す。1, 2, 3, 4, および5は細胞融合より得られるA^+B^+組換え体で2回交差したと考えられるものである。

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より成る雑種である。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 DE 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) との掛け合わせから得られた Ade$^+$ 組換え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$^-$の%出現頻度 (調べた数)	
met	*glt*	*trp*	*leu*	*his*	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		
−	+	+	−	−	1	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 1A484 (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 は生じていない。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うることを認めた。

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	組換え体[b] 数
metC3、lyt-2	aroD120、hisH argA、leu-2	$AroD^+$	Lyt^+	65
			Lyt^-	2
(1A484)	(AC370)		計	67

a. 供与菌 DNA 濃度は 0.05 μg/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、ポリビニルピロリド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%子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mR1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＋カザミノ酸（50μg/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、特に有効と思われる。

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）と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 PBS1 ファージ形質導入法で用いられる連関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* YS11 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^+ 組換え体が得られた。後者では pTP4 プラスミド μg DNA 当り *B. subtilis* 168S 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ない。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ゼラチン、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い出した。血液増補剤を含む液体培地でプロトプラストは膨張しか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っていると思われ、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DeCastro-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い出した。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, r_M^- m_M^- 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

連関を認めた。この連関と似た関係が B. subtilis 染色体で見い出されており（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 + カザミノ酸（50μg/ml）寒天培地を用いると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い出した。

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つほぼ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い出した。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に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μgDNA当り約10^7個、約2×10^4DNA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るプロトプラスト融合を誘導する[1]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いう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pC194）ならびにその誘導体[65,66]（pAC1）をベクターに用い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]を綾ぐ; (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) 挿入不活化遺伝子を持つ[65,66]；(iv) 分泌ベクター[90]でかつ調節支配でき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、移入技術などで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。本研究で見い出した pJKK310 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こ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に思われ、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 pJKK523 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[94]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数多く得ることは、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 Providence 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 inheritence 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 exogeneous 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. galleria 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 Tabacco 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. Calsium-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，　東京大学斉藤日向教授，　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).