

Bacillus subtilisおよびB. megateriumを用いる同種間細胞融合

誌名	食品総合研究所研究報告 = Report of National Food Research Institute
ISSN	03019780
著者名	岡田, 憲幸 塚本, チセ 新国, 佐幸 真鍋, 勝
発行元	農林省食品総合研究所
巻/号	53号
掲載ページ	p. 10-16
発行年月	1989年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



Bacillus subtilis および *B. megaterium* を用いる同種間細胞融合

— プロトプラスト再生培地におけるコロニー出現と高張剤濃度 —

岡田憲幸・塚本チセ・新国佐幸・真鍋 勝

Protoplast Fusion of *Bacillus subtilis* and *B. megaterium*

— On the Tonicity of the Semi-synthetic Protoplast Reversion Medium —

Noriyuki OKADA, Chise TSUKAMOTO, Sayuki NIKKUNI and Masaru MANABE

Establishment of a detection system of fusants is important for cell fusion. For amino acid -negative mutants, it was difficult to make colonies on the reported protoplast reversion medium. The failure was due to the high concentration of sodium succinate which is necessary to maintain protoplasts in the medium. Making colonies was possible only when its concentration was reduced. The reason why it becomes an important factor in the case of bacteria, whereas fungi and yeasts have not any problems about the tonicity, is that it is difficult for bacteria to make colonies in a low water-activity condition. Especially for those amino acid auxotrophic mutants, its problem becomes significant, because a concentration of casamino acid in the medium must be limited. On the protoplast formation, cells were treated at 42°C with lysozyme in the concentration range of 100 to 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 5 to 45 minutes. The fusion frequency was 0.012% between *B. subtilis* mutants and 0.33% between *B. megaterium* mutants.

(Received May 6, 1988)

バクテリアの細胞融合例は数多くみられ有力な育種手段となることが示唆されている¹⁾。最近になって細胞融合法によるビタミンB-12高生産性納豆菌の形成の成功が報告された²⁾。これは *B. subtilis* と *B. megaterium* の異種間で行われたもので、種の障壁を乗り越え融合させたことのもつ意義は大きい。しかしそれだけに投入菌数あるいは再生菌数に対し融合菌数がどれくらいあったか、また復帰変異株がなかったかどうかを示す定量的なデータがほしいところである。定量的把握は、予想される復帰変異に対し、融合株が復帰変異株でないことを示す有力な手段となる。しかし融合を定量的に把握しようとするといくつかの問題点につきあたる。従来のようにプロトプラストを融合後、一度全コロニーを再生させ、次いで融合株を選択する方式をとった場合、定量的把握は困難で、それを行うには、直接再生培地上で融

合株を検出することが必要となる。既報の再生培地に、アミノ酸要求株を用いて直接融合株が選別できるといわれている関口ら^{1,3,4)}により開発されたHC*P再生培地[*はC(カザミノ酸)濃度が極めて低いことを意味]があるが、本再生培地は、著者が得たアミノ酸要求変異株には適用できなかった。その問題点の一つは高張剤にあった。アミノ酸要求株を用いて直接融合株が選別できる再生培地はHC*P再生培地以外には見当たらない。そこで高張剤の観点から上記培地の改良を試みたところ、本実験で得たアミノ酸要求変異株に適用できることが分かった。本報では浸透圧の問題に触れた後、*Bacillus subtilis* および *B. megaterium* を用いて行った同種間細胞融合について報告する。

実験方法

供試菌株

Bacillus subtilis IAM 1207 (S株) から変異させたアミノ酸要求株S9 (thr要求株), S24 (his要求株), および *Bacillus megaterium* IAM 1166 (M株), から変異させたアミノ酸要求株M14 (his要求株), M25 (thr要求株) を用いた。

培地

総菌数計数ならびにプロトプラスト化のチェックの低張栄養培地として「ニッスイ」の一般細菌用普通寒天培地を用いた。プロトプラスト再生培地についてはHC*P培地^{1,3,4)} (1 l 当たり, グルコース 5g, 硫酸 2g, カザミノ酸20mg, K₂HPO₄ 3.5g, KH₂PO₄ 1.5g, トリプトファン0.1g, 塩化マグネシウム1.9g, クエン酸ナトリウム 1g, ポリビニルピロリドン15あるいは30g, コハク酸ナトリウム (pH7.3) 0.5M, 寒天 8g) を基礎に検討を加えた。その組成は「実験結果と考察」の項で示す。培地のオートクレーブはグルコース, 硫酸マグネシウム, ポリビニルピロリドン (必要な場合), シュークローズ (必要な場合), 寒天のグループと, 硫酸, K₂HPO₄, KH₂PO₄, コハク酸ナトリウム (必要な場合), クエン酸ナトリウム, ビオチンのグループの2つに分けて行った。使用時, 寒天を含むグループは沸騰水中で溶かし, 両グループ (前者は10/7倍の濃度のもの7ml, 後者は10/3倍の濃度のもの3ml) を55°Cに保ち混合しシャーレに流した。カザミノ酸, アミノ酸は滅菌フィルターを通した100倍濃度のものを用意し, 培地 (10ml) をシャーレに流し込む前に, 必要に応じその100μlをシャーレにとり添加した。

菌体の調製

変異株を高浸透圧合成培地 (1 l 当たりグルコース 5g, 硫酸 2g, K₂HPO₄ 3.5g, KH₂PO₄ 1.5g, 硫酸マグネシウム0.5g, クエン酸ナトリウム 1g, カザミノ酸500mg, ビオチン100μg, シュークローズ68.46g) で30°C, 24時間培養し, 濃縮小分けて, 12.5%グリセリン中-75°Cで凍結保存した。

プロトプラスト化と再生

凍結保存菌体を高浸透圧緩衝液 (0.5M シュークローズ, 0.02M マレイン酸緩衝液 (pH6.5), 0.02M 硫酸マグネシウム) で遠心洗浄し, 遠沈菌体 (生菌数10⁷~10⁸個) に, 1%牛血清アルブミンを加え (総容量1.5ml, リゾチーム終濃度100~200μg/ml), 42°Cで5~45分処理し, プロトプラスト化した。リゾチー

ム処理菌液に1%牛血清アルブミンを含む高浸透圧緩衝液を加え3mlとし, 同上液で10倍ごとに5段階まで希釈し, 各その100μlを, あらかじめ必要に応じてカザミノ酸, アミノ酸を入れたシャーレにとり, 低張の栄養培地およびプロトプラスト再生培地で混積した。なお牛血清アルブミンはマーカートの発現に障害がないことを確認したのでプロトプラスト保護に常時用いた。またリゾチーム処理中を除き, 操作は可能な限り水中で行った。培養は, シャーレ中の培地の乾燥を防ぐため, 蓋付きのプラスチック容器 (ラストロウエア) に入れ30°Cで行い, 培養2日後より1日置きに約1週間後までコロニーを計数した。該当アミノ酸を添加したプロトプラスト再生培地で出現するコロニー数から再生数を求め, 低張の栄養培地で出現するコロニー数から残存得菌数を, 該当アミノ酸添加で出現するコロニー数から変異もれ菌数をチェックした。平行してリゾチーム無処理の試料を立て投入菌数を求めた。

融合操作

リゾチーム処理して得た2種の異なったプロトプラスト液各1.5mlに, 1%牛血清アルブミンを含む等容量の高浸透圧緩衝液を加え3mlとし, 各その2mlをとり混合した。残りのプロトプラスト液は再生率, 残存桿菌数, 変異もれ菌数のチェックのため用いた。各2mlを混合し遠心分離して得た沈澱菌体に, 0.2mlの1%牛血清アルブミンを含む高浸透圧緩衝液を加え懸濁した後, 40%ポリエチレングリコールを含む高浸透圧緩衝液1.8ml (この時は牛血清アルブミンは含まないものを使用) を加え激しく攪拌し, 水中で1~2分保った後, ただちに1%牛血清アルブミンを含む高浸透圧緩衝液で10倍ごとに5段階まで希釈し, 以下再生の項に記述した方法で各その100μlをとり, プロトプラスト再生培地で混積した。該当アミノ酸無添加のプロトプラスト再生培地で出現するコロニーをもって融合株とした。なお投入菌数, 再生菌数, 残存桿菌数, 変異もれ菌数は常時平行してチェックした。

実験結果と考察

融合を定量的に把握するには, 融合株を直接選別できるプロトプラスト再生培地が必要である。栄養要求マーカートで直接選択できる再生培地に, 関口ら^{1,3,4)}により開発されたHC*P再生培地 (培地基本成分にポリビニルピロリドン1.5~3%, コハク酸ナトリウム0.5M, カザミノ酸20mg/lを含む) がある。しかし著

第1表 再生用培地における生育

	添加成分	生育
基本培地	—	+
〃	1.5%ポリビニルピロリドン	+
〃	0.4Mコハク酸ナトリウム (pH7.3)	—

基本培地 = 1 l 当りグルコース5g, 硫酸アンモニウム2g, K_2HPO_4 3.5g, KH_2PO_4 1.5g, 硫酸マグネシウム2.3g, クエン酸ナトリウム1g, 寒天8g, メチオニン10mg
 供試菌株: *B.subtilis* IAM 1207変異株S8 (met要求株)

第2表 高張剤濃度とコロニーの出現

高張剤	濃度	出現コロニー数/0.1ml	
		ポリビニル ピロリドン ⁺	ポリビニル ピロリドン ⁻
コハク酸ナトリウム(pH7.3)	0.2M	98	774
	0.3M	0	20
	0.4M	0	0
シュクロース	0.2M	1345	6868
	0.3M	0	2560
	0.4M	0	74
	0.5M	0	11
投入菌数 (栄養培地)		9320	9320

第1表の脚注に示す基本成分を用いた。
 供試菌株: S8 (met 要求株)

者らが取得したアミノ酸要求株には本再生培地は適用できなかった。すなわちマーカーが発現できない(マーカーとなるアミノ酸の添加の有無にかかわらずコロニーが出現してしまう現象)か、マーカーが発現できるようカザミノ酸を除けばコロニーが全く出現しなかった。コロニーが出現しないのは本再生培地が特殊な成分を含むためと考えられる。本再生培地は基本的には、バチルス用最小培地に高張剤と再生促進物質が添加されたものである。高張剤と再生促進物質のうちどちらが桿菌の生育を抑制するかを調べると、第1表に示すように、高張剤のコハク酸ナトリウムに原因があることが分かった。そこでその濃度および他の高張剤であるシュクロースを用いた場合の桿菌のコロニーの出現に及ぼす影響について調べると、同濃度比較ではコハク酸ナトリウムよりシュクロースを用いた方がコロニーの出現がよく、しかし両者とも0.5M(コハク酸ナトリウムの場合0.4Mで不能)という濃度はバチルスの生育に

第3表 供試した再生培地

	S再生培地	P再生培地
グルコース	5g	5g
硫酸アンモニウム	2g	2g
K_2HPO_4	3.5g	3.5g
KH_2PO_4	1.5g	1.5g
硫酸マグネシウム	2.3g	2.3g
クエン酸ナトリウム	1g	1g
寒天	8g	8g
ビオチン	100 μ g	100 μ g
ポリビニルピロリドン	—	15g
高張剤		
コハク酸ナトリウム(pH7.3)	—	0.33M
シュクロース	0.2M	—

P再生培地はHC*P再生培地をもとに調製

は厳しいことが示された(第2表)。そこで高張剤の濃度を下げたプロトプラスト再生用培地を調整しその再生を試みた。既報の文献にコハク酸ナトリウム0.33Mを使用したプロトプラスト再生例⁵⁾がみられることから、コハク酸ナトリウム濃度を0.5Mから0.33Mに下げたP再生培地と、シュクロース0.2Mを使用したプロトプラスト再生例⁶⁾ならびにポリビニルピロリドンが添加されていない方がいくぶんコロニーの出現がよいことが第2表でみられたため、新たにS再生培地(培地基本成分に0.2Mシュクロースを含み、ポリビニルピロリドンは含まない)を作り、両再生培地における桿菌のコロニー出現率とプロトプラストの再生率を比較した。なお統報⁷⁾で示すようにカザミノ酸濃度を検討した結果、プロトプラストの再生にはカザミノ酸は欠かせず、1mg/lの添加ならマーカーの発現に支障がないことから両再生培地にはカザミノ酸1mg/lを添加した。供試した両再生培地の組成を第3表に示す。第4, 5表に示すように、S再生培地ではリゾチーム処理前の桿菌のコロニー出現率は、*B.subtilis*でほぼ100%、*B.megaterium*で50%、P再生培地では20% (*B.megaterium*) ~75% (*B.subtilis*)で、S再生培地の方が高い値を示した。一方プロトプラストの再生率はS再生培地では0.001% (*B.megaterium*) ~0.008% (*B.subtilis*)と極めて低いのに対し、P再生培地ではその1000倍ほど高い5% (*B.subtilis*) ~13% (*B.megaterium*)の値を示した。すなわちS再生培地は桿菌の生育には適しているがプロトプラストの再生には不適であるこ

第4表 *B. subtilis*^{a)}のプロトプラスト再生における再生培地の比較

	培地	出現コロニー数/0.1ml希釈度			コロニー出現率 または再生率 (%)
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
投入菌数	栄養培地	10 ⁴	2008	247	100
リゾチーム処理前	S再生培地	10 ⁴	2262	246	100
リゾチーム処理前	P再生培地	10 ⁴	1942	186	75
プロトプラスト	S再生培地	2	0	0	0.008
プロトプラスト	P再生培地	2042	114	9	5
残存桿菌	栄養培地	0	0	0	0

a) *B. subtilis* IAM 1207変異株S24 (his要求株)
S, P両再生培地にはカザミノ酸1mg/lおよびhis 10mg/l添加
リゾチーム処理条件: 100μg/ml, 42°C, 30分

第5表 *B. megaterium*^{a)}のプロトプラスト再生における再生培地の比較

	培地	出現コロニー数/0.1ml希釈度			コロニー出現率 または再生率 (%)
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
投入菌数	栄養培地	10 ⁴	10 ³	809	100
リゾチーム処理前	S再生培地	10 ⁴	2957	403	50
リゾチーム処理前	P再生培地	10 ⁴	1063	161	20
プロトプラスト	S再生培地	9	3	0	0.001
プロトプラスト	P再生培地	10 ⁴	1143	106	13
残存桿菌	栄養培地	0	0	0	0

a) *B. megaterium* IAM 1166変異株M25 (thr要求株)
S, P両再生培地にはカザミノ酸1mg/lおよびthr 10mg/l添加
リゾチーム処理条件: 100μg/ml, 42°C, 5分

とが示された。それに対しポリビニルピロリドンが添加されたP再生培地は桿菌の生育は多少劣るが、プロトプラストの再生には非常な効果があることが示された。シュクロース0.2M中でプロトプラストは維持再生されることは知られており、プロトプラストの再生率が低いのはシュクロースの濃度が低いためにはなく、ポリビニルピロリドンが添加されていないためと考えられる。ポリビニルピロリドンの再生効果が改めて確認されるとともに、桿菌のコロニー出現とプロトプラストの再生は別の現象であることが推察される。結論として、ポリビニルピロリドンの添加されたHC*P培地を改変して、コハク酸ナトリウム濃度は0.5Mから0.33Mに下げれば、本実験で取得したアミノ酸要求変異株に適用可能であることが分かった。

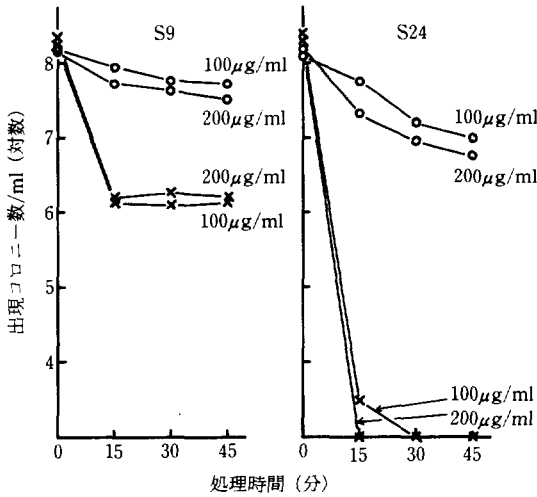
微生物の細胞融合でカビや酵母では浸透圧の問題が全く問題とならないのに対し、バクテリアで問題

となるのは以下の理由にあると考えられる。すなわち、水分の少ない保存食品にカビが生え、糖分を含む液が酵母で発酵することはよく知られているように、カビや酵母は低水分活性に強い。それに対しバクテリアは酵母やカビより低水分活性に弱く高水分活性を好む。たとえばカビが生育する最低水分活性は0.80、酵母は0.88~0.94に対し、バクテリアは0.94~0.99で、最適水分活性はほとんど1.0に近く、0.995以上の値を示すといわれている⁸⁾。ちなみに水分活性0.995は溶質のモル濃度約0.28モルに相当し、この濃度以上ではバクテリアの生育が困難となることを意味する。とりわけアミノ酸要求株を用いた場合、添加栄養分を制限する必要が生じ、コロニー出現に及ぼす水分活性ひいては浸透圧の問題が一層大きくなると考えられる。

以上のことに照らし合わせ、高張剤濃度と添加栄養分の観点から既報の再生培養を改めて見直すと(第

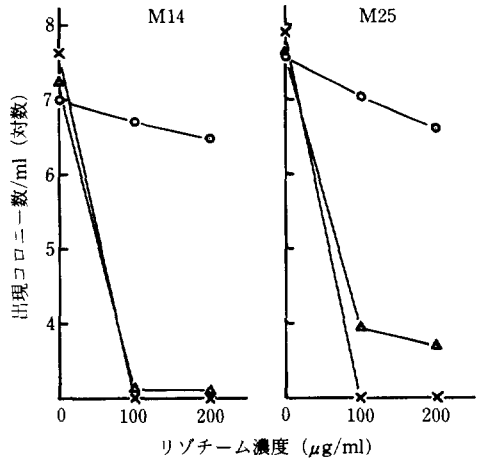
第6表 バチルス属のプロトプラスト再生培地における高張剤濃度と添加栄養分

高張剤	濃度	添加栄養分	培地名	供試菌 (融合株検出法)	文献
I	コハク酸ナトリウム 0.5M	カザミノ酸0.5%	DP	<i>B. subtilis</i> (間接)	Landman(1968) ⁹⁾
II	コハク酸ナトリウム 0.5M	カザミノ酸0.5%	DPA	<i>B. subtilis</i> (間接)	Wyrick(1973) ¹⁰⁾
III	コハク酸ナトリウム 0.33M	カザミノ酸なし マーカ-発現に影響しない 4種のアミノ酸	R	<i>B. subtilis</i> (直接)	Gabor(1979) ⁵⁾
IV	シュクロース 0.2M	なし	Hypertonic medium	<i>B. megaterium</i> (直接)	Fodor(1975) ⁶⁾



第1図 S系変異株のプロトプラスト再生
—処理時間の影響—
S系変異株：親株 *Bacillus subtilis*
IAM 1207

○：P再生培地における出現コロニー数
×：栄養培地における出現コロニー数
リゾチーム処理濃度：100µg/mlまたは
200µg/ml
リゾチーム処理温度：42°C



第2図 M系変異株のプロトプラスト再生
—処理濃度の影響—
M系変異株：親株 *Bacillus megaterium*
IAM 1166

○：P再生培地における出現コロニー数
△：R再生培地における出現コロニー数
×：栄養培地における出現コロニー数
リゾチーム処理温度：42°C
処理時間：M14株30分 M25株5分

6表), Landman(1968)⁹⁾はコハク酸ナトリウム0.5Mでカザミノ酸5g/lを, Wyrick(1973)¹⁰⁾もコハク酸ナトリウム0.5Mでカザミノ酸5g/lを, Gabor(1979)⁵⁾はコハク酸ナトリウム0.33Mで,カザミノ酸なしのかわりにマーカ-発現に影響のない4種のアミノ酸を添加, Fodor(1975)⁶⁾はシュクロース0.2Mでカザミノ酸なしの完全合成培地を使用している。

ただしFodorは*B. megaterium*を供試している。*B. subtilis*と*B. megaterium*の違いがあるものの,これらの培地から栄養分が豊富であれば浸透圧が高く,栄養分が少ないか無添加の場合は浸透圧も低いという相関があり,本結果との符号が見出される。

次に,リゾチーム処理について,プロトプラストの精製とその再生に及ぼす作用濃度,処理時間の影

第7表 *B. subtilis*間の細胞融合

菌 株	添 加 アミノ酸	コロニー 出 現 数	プロトプラ スト再生数	再生率 %	融合数	融合率 ^{a)} %
<i>B. subtilis</i>						
S9 (thr要求)	thr	1.5×10^6	3.3×10^7	22		
	—	0	0			
S24 (his要求)	his	1.5×10^6	1.2×10^7	8		
	—	0	0			
S9 (thr要求) × S24 (his要求)	—				1.4×10^3	0.012

培地：P再生培地 + 1 mg/l カザミノ酸

a) 融合率 = (融合数 ÷ 再生数の小さい方の菌株の再生数) × 100

第8表 *B. megaterium*間の細胞融合

菌 株	添 加 アミノ酸	コロニー 出 現 数	プロトプラ スト再生数	再生率 %	融合数	融合率 ^{a)} %
<i>B. megaterium</i>						
M14 (his要求)	his	3.7×10^6	3.0×10^6	81		
	—	0	0			
M25 (thr要求)	thr	4.4×10^6	5.8×10^6	100		
	—	0	0			
M14 (his要求) × M25 (thr要求)	—				9.8×10^3	0.33

培地：P再生培地 + 1 mg/l カザミノ酸

a) 融合率 = (融合数 ÷ 再生数の小さい方の菌株の再生数) × 100

響を第1図、第2図に示す。リゾチーム処理条件は取得した菌体の培養条件に左右されるため普遍的な値というものはなくそのつど調べる性質のものであるが、ここに本実験に供試した菌体の場合について示す。なおここではグリセリン中で -75°C に凍結保存した凍結菌体を用いた。リゾチーム処理条件が強いとリゾチーム無傷菌の出現は低下するが再生率も低下し、逆に弱いとコロニー出現率は高いがリゾチーム無傷菌の出現も多くなることは予想された結果であるが、再生率が高くかつリゾチーム無傷菌の出現が低いという両者を満足させる条件は、処理温度 42°C の場合、いずれの菌体についても、リゾチーム濃度 $100 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ 、時間 $5 \sim 45$ 分の範囲にあった。個別的な特長をみるとS9凍結菌体はリゾチーム耐性菌の出現が多いため処理条件を強く、M25凍結菌体はプロトプラスト再生率が低いため処理条件を弱くす

る必要があった。そこでリゾチーム濃度と処理温度はいずれの場合も $125 \mu\text{g/ml}$ 、 42°C で行い、処理時間を変えることにより処理条件を調節した。すなわちS9菌体は45分、S24とM14菌体は30分、M25菌体は5分で行うことにした。

以上の結果ならびに続報の結果を踏まえ、同種間の細胞融合を行った。その結果を第7、8表に示す。*B. subtilis*間では0.012%、*B. megaterium*間では0.33%の融合率を得た。

要 約

細胞融合を定量的に把握するには、再生培地で直接融合株を選別できる検出システムをつくる必要である。供試アミノ酸要求変異株は直接融合株が選別出来るとされているプロトプラスト再生培地でコロニーの出現がみられなかった。原因は高張剤

のコハク酸ナトリウムにあった。高張剤は培地の浸透圧を高めプロトプラストの維持に欠かせないが、従来の濃度を低下させることによりコロニーの出現が可能となった。カビや酵母で浸透圧が全く問題とならないのに対しバチルスで問題となるのは、バチルスは高浸透圧中で生育しにくいためと考えられる。とりわけ供試菌にアミノ酸要求株を用いた場合、添加栄養分を制限する必要が生じ、浸透圧の問題を一層大きくすることが分かった。この点につき既報のいくつかの再生培地を付合わせると本結果と符合することが見出された。プロトプラスト生成に関し、リゾチーム処理条件は、温度42°Cの場合、リゾチーム濃度100~200 μ g/ml, 時間5~45分の範囲にあった。以上の結果ならびにマーカーの発現に関する統報の結果を踏まえ、同種間の細胞融合を行った。その結果、*B.subtilis*間では0.012%, *B.megaterium*間では0.33%の融合率を得た。

文 献

- 1) 元山裕孝：遺伝子組換え実用化技術，第3集，p133 (1982).
 - 2) 長谷川喜衛・狗田徹・小幡斉・徳山泰：日食工試，35, 154 (1988).
 - 3) AKAMATSU, T. and SEKIGUCHI, : *J. Agric. Biol. Chem.*, 45, 2887 (1981).
 - 4) AKAMATSU, T. and SEKIGUCHI, : *J. Agric. Biol. Chem.*, 48, 651 (1984).
 - 5) GABOR, M. H. and HOTCHKISS, R. D. : *J. Bacteriol.*, 137, 1346 (1979).
 - 6) FODOR, K., HADLACZKY, G. and ALFÖLDI, L. : *J. Bacteriol.*, 121, 390 (1975).
 - 7) 岡田憲幸・塚本チセ・新国佐幸・真鍋勝：食総研報，53, 17 (1989).
 - 8) 好井久雄，金子安之，山口和夫：食品微生物学，改訂1版，p.72 (1976).
 - 9) LANDOMAN, O. E., RYTER, A. and FREHEL, C. : *J. Bacteriol.* 96, 2154 (1968).
 - 10) WYRICK, P. B. and ROGERS, H. J. : *J. Bacteriol.* 116, 456 (1973).
- 1) 元山裕孝：遺伝子組換え実用化技術，第3集，