

バチルス属栄養要求変異株のプロトプラスト再生培地におけるマーカー発現

誌名	食品総合研究所研究報告 = Report of National Food Research Institute
ISSN	03019780
著者	岡田, 憲幸 塚本, チセ 新国, 佐幸 真鍋, 勝
巻/号	53号
掲載ページ	p. 17-22
発行年月	1989年3月

バチルス属栄養要求変異株のプロトプラスト 再生培地におけるマーカー発現

岡田憲幸・塚本チセ・新国佐幸・真鍋 勝

Marker Expression by Mutants of *Bacilli* on a Semi-synthetic Protoplast Reversion Medium

Noriyuki OKADA, Chise TSUKAMOTO, Sayuki NIKKUNI and Masaru MANABE

A success of protoplast fusion depends largely on the selection method of fusants. Though amino acid-negative mutants did not reveal their markers on the protoplast reversion medium containing 20mg/l of casamino acids, their marker expression was attained when the content of casamino acids was reduced to 1 mg/l. Applying the revised reversion medium, the colony forming frequency of *Bacilli* became 75 to 86% with *B.subtilis* mutants and 7 to 20% with *B. megaterium* mutants, and the regeneration frequency of protoplasts turned to be 7 to 30% with both mutants. The amino acid markers were expressed without appearing colonies when the corresponding amino acids were removed. Those results almost satisfied the condition of direct selection of fusants. (Received May 6, 1988)

細胞融合の成否は融合株の選別システムの開発如何にかかっている。前報¹⁾ではマーカー発現については触れ得ず細胞融合結果のみを示したので本報でそれを示す。バクテリアの場合顕微鏡下で融合コロニーと未融合コロニーの区別はできないため、一般的には単独ではコロニーが出現しない変異株を用意し、融合したコロニーのみが出現できるようにする。したがって融合株を直接検出するためにはマーカーがプロトプラスト再生培地でも発現される必要がある。従来は*B.subtilis*の融合では、栄養要求マーカーの発現とプロトプラストの再生を同時に行うことができず、融合株、未融合株すべてを再生させ、その中から融合株を選別する方法がとられていた²⁾。この不便さを解消するため関口ら³⁾は融合株を再生培地上で直接選別できるHC*P再生培地を開発した。この再生培地は1リットルあたり20^{3,4)}~50mg⁵⁾という極微量のカザミノ酸を含んでいるがカザミノ酸が極めて少ないためアミノ酸要求変異株を用いても直接融合株を選別できる特長があるとされている。しかしながら

本実験で得たアミノ酸要求変異株にHC*Pに近似する再生培地を適用したとき、いずれも該当アミノ酸を加えなくてもコロニーが出現し使用は不可能であることが分かった。プロトプラストの再生にはカザミノ酸の添加は欠かせないため、アミノ酸マーカーが発現できかつプロトプラストが再生するカザミノ酸濃度を検討し、一応の成果を得ることができたので報告する。

実験方法

供試菌株

Bacillus subtilis IAM 1207と*Bacillus megaterium* IAM 1166を親株に用い、アミノ酸要求変異株を作出し実験に用いた。

培地

総菌数計数用ならびにプロトプラスト化チェック用の低張の栄養培地として「ニッスイ」の一般細菌用普通寒天培地を用いた。菌体の調製用に、高浸透圧ブイオン培地(1 l当たり乾燥ブイオン「ニッスイ」

30gにシュクロース68.46gを添加)あるいは高浸透圧合成液体培地(1 l当たりグルコース5g, 硫酸2g, K_2HPO_4 3.5g, KH_2PO_4 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100 μ g, シュクロース68.46g)を用いた。アミノ酸要求変異株取得用の基礎培地としてバチルス用最小培地を用いた。その組成は1 l当たり, グルコース5g, 硫酸2g, K_2HPO_4 3.5g, KH_2PO_4 1.5g, 硫酸マグネシウム0.5g, クエン酸ナトリウム1g, ビオチン100 μ gとし, レプリカ用には寒天20gを添加した。プロトプラスト再生用寒天培地には関口ら³⁻⁵⁾が開発したHC*P培地[1 l当たり, グルコース5g, 硫酸2g, カザミノ酸20mg, K_2HPO_4 3.5g, KH_2PO_4 1.5g, トリプトファン0.1g(トリプトファン要求株使用のため), 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15gないし30g, 2Mコハク酸ナトリウム(pH7.3)250ml, 寒天8g]を基礎にP再生培地を調製し実験に供した。P再生培地1 l当たりの組成は, グルコース5g, 硫酸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, ポリビニルピロリドン15g, 1.67Mコハク酸ナトリウム(pH7.3)200ml, ビオチン100 μ g, 寒天8gとした。HC*PとP再生培地の組成は, コハク酸ナトリウム濃度, マグネシウム塩の種類, トリプトファン, ビオチンの有無などの点で異なる。栄養培地などを除くいずれの合成培地もオートクレーブは, 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), シュクロース(必要な場合), 寒天のグループと, 硫酸, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , 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つに分けて行い, 使用直前に混合し用いた。寒天を含むものは100°Cで溶解した後, 55°Cに保ち使用直前に混合した。カザミノ酸, アミノ酸は滅菌フィルターを通した100倍濃度のものを別に用意し使用時添加した。

変異株の作出

変異株の作出は微生物遺伝学実験法⁶⁾に準じ以下のように行った。ニトロソグアニジン(100 μ g/ml)で突然変異誘発処理(37°C, 20分)した菌体集団を, バチルス用最小培地に移し未変異親株が増殖し始めたころペニシリン(500U/ml)を添加し未変異親株を殺し, 次いで生残った菌体集団をカザミノ酸を添加したバチルス用最小培地で増殖させ, カザミノ酸要求株群を濃縮した。このペニシリン濃縮処理を3回繰返した後, マスタープレートをつくりカザミノ

酸添加および無添加のバチルス用最小寒天培地にレプリカし, カザミノ酸添加で生育し無添加で不生育のコロニーをマスタープレートより釣り上げた。次いで種々のアミノ酸を添加したバチルス用最小寒天培地でレプリカ法により生育の有無を調べ, どのアミノ酸を要求するかを決定した。各変異株は高浸透圧ブイヨン培地あるいは高浸透圧合成液体培地で30°C, 24時間培養し, 濃縮小分けして, 12.5%グリセリン中で-75°Cに凍結保存した。

プロトプラスト化と再生

調製した凍結保存菌体(生菌数 $10^7 \sim 10^8$ 個)を高浸透圧緩衝液(0.5Mシュクロース, 0.02Mマレイン酸緩衝液(pH6.5), 0.02M硫酸マグネシウム)で遠心洗浄した菌体に, 1%牛血清アルブミンを添加した同上高浸透圧緩衝液とリゾチームを加え(総容量1.5ml, リゾチーム終濃度125 μ g/ml \sim 250 μ g/ml), 42°Cで8 \sim 45分処理し, プロトプラスト化した。プロトプラスト化は顕微鏡による観察, ならびに低張の栄養培地での不生育から, またマーカーの発現はP再生培地における該当栄養成分の添加で生育, 無添加で生育しないことからチェックした。これらは平行して調べた。すなわちリゾチーム処理した菌液を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, 必要に応じあらかじめカザミノ酸, アミノ酸を入れたシャーレに希釈菌液の100 μ lをとり, 溶かし55°Cに保ったP再生培地ならびに低張の栄養培地(一般細菌用普通寒天培地「ニッスイ」)で混積し, 培養後出現するコロニーを調べた。培養は30°Cで, 約7日後まで行ったが, その間シャーレ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)に入れて行った。

実験結果と考察

常法によりニトロソグアニジン処理による変異の誘発, ペニシリン処理による変異株の濃縮, レプリ

第1表 アミノ酸要求変異株

変異株名	要求アミノ酸	変異株名	要求アミノ酸
S8	met	M5	cys
S9	thr	M7	thr
S18	met	M14	his
S24	his	M25	thr

S系番号の親株: *Bacillus subtilis* IAM 1207
M系番号の親株: *Bacillus megaterium* IAM 1166

第2表 微量のカザミノ酸を含む再生培地におけるアミノ酸要求株のマーカ発現の試み

菌 株	アミノ酸	コロニー出現	菌 株	アミノ酸	コロニー出現
S8	—	+	M5	—	+
	met	+		cys	+
S9	—	+	M7	—	+
	thr	+		thr	+
S18	—	+	M14	—	+
	met	+		his	+
S24	—	+	M25	—	+
	his	+		thr	+

培地：P再生培地+カザミノ酸濃度20mg/l (HC*Pに近似の培地)
HC*Pに近似する再生培地ではいずれもマーカが発現されなかったことを示す。

第3表 S系変異株のマーカ発現に及ぼすカザミノ酸濃度の影響

カザミノ酸濃度 (mg/l)	アミノ酸添加	出現コロニー数
0	met	20
0	—	0
10	met	10 ⁴
10	—	0
20	met	10 ⁴
20	—	10 ⁴
50	met	10 ⁴
50	—	10 ⁴
総菌数 (栄養培地)		10 ⁴

培地：P再生培地 菌株：S8 (met要求株)

カ法によるスクリーニングを経て、各種アミノ酸要求変異株を得た。そのうち本実験で採用した主なアミノ酸要求変異株を第1表に示す。これらはバチルス用最小培地でアミノ酸要求性が確認されたものである。すなわち該当するアミノ酸が添加されていればコロニーが出現し、添加されていなければ出現しないことが確認された。

バチルス用最小培地で確認されたアミノ酸要求変異株はいずれも、P再生培地にカザミノ酸を20mg/l添加した培地では、該当するアミノ酸を加えなくてもコロニーが出現し、HC*P培地に近似する再生培地の使用は不可能であった(第2表)。後出のようにカザミノ酸を除けばプロトプラストの再生率が低下す

る。そこでカザミノ酸の濃度に注目し要求アミノ酸を添加したときのみ生育する条件を検討したところ、*B.subtilis*を親株とする一変異株では10mg/l、*B.megaterium*を親株とする一変異株では1mg/lまで下げたところでマーカが発現した(第3, 4表)。すなわち該当アミノ酸の添加で生育、無添加で不生育であることが示された。従って両菌種を満足させるカザミノ酸濃度は1mg/lが適当と考えた。

一方、アミノ酸要求変異株から供試用菌体をとるため液体培養し、得た菌体をカザミノ酸1mg/lが添加されたP再生培地でコロニー分析すると、復帰変異株出現が原因と考えられる変異もれ集団に変わってしまう現象がしばしばみられた。そこで菌体を次のように調製した。カザミノ酸無添加のP再生培地上ではコロニー出現率(栄養培地上の全コロニー出現数に対するP再生培地上のコロニー出現数の率)がほとんどゼロに近いが、投入菌数を多くし調べるとカザミノ酸を加えなくても出現するコロニーがみられる。このとき出現するコロニーを種としコロニーからコロニーへと分離を繰返すと、カザミノ酸無添加のP再生培地でコロニー出現率の高かつ復帰変異のない集団に濃縮されるのがみられた(第5表)。しかしその1コロニーを種に液体培養を行うと、得た菌体集団は再びカザミノ酸1mg/lが添加されたP再生培地でコロニー出現率の低いかつ変異もれを起こすもとの集団に戻る場合があることが分かった。このことから実験ごとに培養し菌体を得る方法では再現性が不十分となることがわかり、菌体を凍結保存し実験に供することにした。すなわち、カザミノ酸無添加のP再生培地で十分に馴らしたコロニーを種

第4表 M系変異株のマーカージ現に及ぼすカザミノ酸濃度の影響

カザミノ酸濃度 (mg/l)	アミノ酸添加	出現コロニー数/0.1ml			
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
0	his	0	0	0	
0	-	0	0	0	
1	his	114	4	0	
1	-	0	0	0	
2	his	305	19	4	
2	-	602	72	11	(微小コロニー)
5	his	385	38	5	
5	-	1016	97	8	(小コロニー)
総菌数 (栄養培地)		10 ⁴	401	50	

培地：P再生培地 菌株：M14 (his要求株)

第5表 変異株の濃縮例

		S 8 株				M 7 株		
		分離 1	分離 2	分離 3		分離 1	分離 2	分離 3
全コロニー数		10 ⁴	695	613		10 ³	3662	2485
P再生培地	+met	17	660	531	+thr	4	2091	2308
P再生培地	-met	0	0	0	-thr	0	0	0
P再生培地+アミノ酸に おけるコロニー出現率		0.17%	95%	87%		0.4%	57%	93%

全コロニー：栄養培地に出現するコロニー

P再生培地：カザミノ酸無添加で使用

として液体培養を行い、得た菌体をコロニー分析し、同培地上でコロニー出現率が高く、変異もれのないアミノ酸要求性を示す菌体集団を選別して残し、それを12.5%グリセリン中-75°Cに凍結保存し実験に供した。

このようにして得た菌体の中には、第6表に示すように、カザミノ酸1mg/lが添加されたP再生培地で良好な結果を示すものがみられた。投入菌数(栄養培地で出現するコロニー数)に対するコロニー出現率は、S株で75~86%、M株で7~20%の値を得、またマーカは、S24株(his要求)、M14株(his要求)では、要求アミノ酸を除けばコロニーの出現はみられず発現することが示された。S9株(thr要求)、M25(thr要求)では微量に加えられたカザミノ酸の影響で極微少コロニーが出現するのが拡大鏡下で観察されたが、しかしこの極微少コロニーは通常のコロニーとは大きさの点で異なるので融合により生じ

た融合株の判定は可能である。プロトプラスト化とその再生率については、第7表に示すように、菌種によりリゾチーム耐性菌が多少みられるものがあったが、再生率は7~24%の値を示した。カザミノ酸の影響については、桿菌の場合、菌株によりカザミノ酸無添加でも高頻度のコロニー出現をみたが、プロトプラストの場合、カザミノ酸無添加では出現率は著しく低下するか(S24株)、出現しても希釈に応じた菌数がみられないなどの現象がみられ(S9株)、カザミノ酸の添加が欠かせないことを示している。次に、第8表に、プロトプラストの再生と再生後のマーカージ現を示す。プロトプラスト再生後にもマーカージ現し変異もれコロニーが出現しないことが確認された。

以上から、カザミノ酸1mg/lを添加したP再生培地で、改良すべき点は有するものの、アミノ酸要求株を用いた場合でも、コロニー出現率、マーカージ

第6表 凍結保存菌体の再生培地におけるコロニー出現とマーカー発現

菌 株	アミノ酸	出現コロニー数/0.1ml					出現率	
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		10 ⁻⁵
S9								
投入菌数					10 ⁴	1620	180	100%
再生培地	thr				10 ⁴	1391	149	86%
	-	極微コロニー (計数不能)		0	0			
S24								
投入菌数					10 ⁴	2008	247	100%
再生培地	his				10 ⁴	1942	186	75%
	-	0	0	0	0			
M14								
投入菌数					10 ³	402	43	100%
再生培地	his				10 ⁴	31	0	7%
	-	0	0	0	0			
M25								
投入菌数					10 ³	976	107	100%
再生培地	thr				10 ³	193	27	20%
	-	極微コロニー (計数不能)		0	0			

投入菌数：栄養培地使用

再生培地：P再生培地+カザミノ酸1mg/l

第7表 カザミノ酸のプロトプラスト再生効果

菌 株	カザミノ酸 (1mg/l)	出現コロニー数/0.1ml			出現率
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
S9 (thr要求株)					
リゾチーム処理前	+	10 ³	477	42	100%
	-	130	11	1	0.2%
プロトプラスト	+	1175	114	15	24%
	-	616	0	0	<13%
残存桿菌数		38	4	0	0.8%
S24 (his要求株)					
リゾチーム処理前	+	10 ³	811	80	100%
	-	10 ³	745	66	92%
プロトプラスト	+	578	58	6	7%
	-	93	3	0	1%
残存桿菌数		0	0	0	0%

使用培地：P再生培地+該当アミノ酸 (S9：+thr, S24：+his)

残存桿菌数：プロトプラスト化後栄養培地に出現するコロニー数

リゾチーム処理条件：125μg/ml, 42°C, 30分

第8表 再生培地におけるプロトプラストの再生と再生後のマーカー発現

菌 株	アミノ酸 (10mg/l)	出現コロニー数/0.1ml					出現率
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
S24							
リゾチーム処理前				10 ³	782	77	100%
プロトプラストの再生	+his		10 ³	451	72		9%
	-his	0	0	0			0%
残 存 桿 菌		87	10	1			0.01%
M14							
リゾチーム処理前				1786	224	9	100%
プロトプラストの再生	+his		10 ³	464	67		30%
	-his	0	0	0			0%
残 存 桿 菌		0	0	0			0%

使用培地：残存桿菌=栄養培地使用 リゾチーム処理前、プロトプラスト=P再生培地+カザミノ酸 1 mg/l 使用
 残存桿菌数：プロトプラスト化後栄養培地に出現するコロニー数
 リゾチーム処理条件：125μg/ml, 42°C, 30分

発現、プロトプラストの再生、再生後のマーカーの発現など、直接融合株を選別するうえで必要な条件を満たすことができた。これらをもとに行った細胞融合については前報に示した。

なおアミノ酸要求株を用いた場合の問題点として、得た菌体集団によっては、コロニー出現率（栄養培地に出現するコロニー数に対するP再生培地に出現するコロニー数）が極めて低い場合があり、普遍的に使用可能とするにはさらに検討が必要と思われる。継続して調べたいと考えている。

要 約

細胞融合の成否は融合株の選別手段の有無にかかっている。*B.subtilis* (S), *B.megaterium* (M) よりアミノ酸要求変異株を得たが、これらのマーカーは既報の再生培地（カザミノ酸濃度20~50mg/l含む）では発現できなかった。既報の再生培地を基礎にプロトプラストが再生できかつマーカーが発現できる培地条件検討し、カザミノ酸濃度を1 mg/lまで下げると可能であることが分かった。新しく作った再生

培地では、投入菌数に対するコロニー出現率は、S系変異株で75~86%, M系変異株で7~20%, プロトプラスト再生率は7~30%の値を得、変異もれもなくマーカーの発現が可能で、ほぼ直接融合株を選別する条件を満たすことができた。

文 献

- 1) 岡田憲幸・塚本チセ・新国佐幸・真鍋勝：食総研報, 53, 10 (1989).
- 2) WYRICK P.B. and ROGERS H.J. : *J.Bacteriol.* 116, 456 (1973).
- 3) 元山裕孝：遺伝子組換え実用化技術第3集, サイエンスフォーラム, p.133 (1982).
- 4) AKAMATSU, T and SEKIGUCHI, J : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2887 (1981).
- 5) AKAMATSU, T and SEKIGUCHI, J : *Agric. Biol. Chem.*, 48, 651 (1984).
- 6) 柳田友道：微生物学実験法, 講談社, p.294 (1976).