

9003 Na⁺,K⁺イオンによる新しい遺伝子導入法の開発

正田 誠(東京工業大学)

研究目的

微生物をプラスミドで形質転換する法としては二つの方法すなわち、コンピテントセル法とプロトプラスト法がよく用いられている。我々は化学農薬に替わる微生物農薬に利用できる枯草菌を分離することに成功している。この菌の遺伝子の解析および遺伝子操作において、上記二つの方法により形質転換を試みたが、予想に反して、まったく形質転換が起こらず、上記二つの方法に替わる新たな方法の開発に着手し、ここで述べるNa⁺,K⁺といったアルカリ金属カチオンによる形質転換法を作り上げることに成功した。

研究方法

使用した枯草菌はBacillus subtilis MI113などの標準株3株と微生物農薬として使用可能な枯草菌4株である。また使用したプラスミドは pC194(Cm^r)と pUB110(Km^r)である。プラスミドおよび染色体DNAの調製は常法によった。B. subtilis の形質転換はL培地で37℃、一晩好気培養した菌液を1%、新しいL培地に植菌し振とう培養した後、10mlの培養液を遠心分離により集菌し、10mlのTE緩衝液で洗浄後、10mlのTE緩衝液に懸濁した。この1mlを試験管にとり、遠心分離を行い、沈澱した菌体を金属イオンを含む1mlの溶液に懸濁し、1時間30℃で振とうした。この液にプラスミド(約1μg)を加え、30℃で30分静置した。次に70%ポリエチレングリコール(PEG)6000を0.1ml加え、静かに混合した。1時間30℃で静置した後、42℃で5分加熱し、速やかに30℃で10分冷却した。4mlのL培地を加え、遠心分離を行った。次に菌体を1mlのL培地に懸濁し37℃で4時間好気培養培養し、遺伝子の発現を行った後、抗生物質を含むL寒天培地に塗抹した。

研究結果と考察

B. subtilis を種々のカチオン類で処理したところ、アルカリ金属カチオンが有効で、特に Na⁺,K⁺ の飽和濃度で処理すると形質転換効率が著しく高いことが明らかになった。この結果を基に最適条件の検討を行った。温度は30℃、菌濃度は5 x 10⁷ (cells/ml)、PEG6000を用いた場合最大の形質転換効率が得られた。DNAの形状はモノマーDNA、線状プラスミドが形質転換され、上記二方法では利用できないDNAも形質転換可能であった。従来法で形質転換できない枯草菌すべてが高い頻度で形質転換された。微生物農薬として利用の期待がもたれている枯草菌も初めて遺伝子の導入が可能となり、組換え体を得ることができた。この方法は上記二方法の欠点を補う新しい形質転換であり、迅速かつ安全に有用菌に利用できる第三の方法であることが証明された。

9003 Na^+, K^+ イオンによる新しい遺伝子導入法の開発

正田 誠(東京工業大学)

◇研究目的

従来まで微生物をプラスミドで形質転換する法としては二つの方法すなわち、コンピテントセル法とプロトプラスト法がよく用いられている。コンピテント法（1、2）と呼ばれる方法は比較的手軽で受容菌の維持も簡単であることを特徴とする。しかしこの方法は二つの大きな欠点がある。第一に使用するプラスミドはオリゴマーであることが必須である。第二はこの方法が適用できる微生物が限られていることである。一方プロトプラスト法（3）はモノマープラスミド、線状プラスミドにも適用でき、かつ使用できる微生物の種の範囲が広いことが特徴である。しかしこの方法は操作が極めて複雑であり、かつ遺伝子が挿入された後の受容菌の選択に栄養要求性の特徴を使用できないという欠点がある。

さて、我々は化学農薬に替わって、環境にやさしい微生物農薬を作り出す研究を行い各種の枯草菌 *Bacillus subtilis* をその候補として分離することに成功している（4、5）。その過程で、この菌の遺伝子の解析および遺伝子操作においてプラスミドの形質転換を行わざるを得なくなり、上記二つの方法を試みた。しかし予想に反して、まったく形質転換が起こらないこと見出しその理由を検討した。その結果、上記の方法は枯草菌でもMarburg株といった研究の都合で種々の遺伝子に変異を加え、遺伝子が挿入されいように人為的に作られた菌において開発されたもので、我々がこの研究において自然界から見つけた枯草菌のようにきわめて外部からの遺伝子導入に防御機構が備わった菌には使用できないことが明らかになった。そこで、上記二つの方法に替わる新たな方法の開発に着手し、ここで述べる Na^+, K^+ といったアルカリ金属カチオンによる形質転換法を作り上げることに成功した。

◇1. 研究方法

1.1 本研究で用いた菌株およびプラスミドをTable 1に示す。

1.2. 培地組成

L 培地組成：ポリペプトン10 g, 酵母エキス5 g, NaCl 5 g、を蒸留水 1リットル（ $\text{PH}=7.2$ ）に溶解した。

L 寒天培地：L 培地に15 gの寒天を添加した。

コンピテントセル法における最少培地：(6)の論文を参照して用いた。

これらの培地に必要の時アミノ酸(50 μg/ml)添加した。

TE緩衝液：10 mM Tris-HCl と 1.0 mM disodium EDTA (pH = 8.0)を添加した。

金属イオンはすべて蒸留水に溶解した。

Table 1. Bacterial strains and plasmids used.

	Relevant characteristics
<i>B. subtilis</i> MI113	<u>arg-15</u> , <u>trpC2</u> , <u>hsmM</u> , <u>HsrM</u>
MI115	<u>leuC7</u> , <u>recE4</u>
168	<u>trpC2</u>
NB22	Iturin+
UB24	Iturin+
YB8	Iturin+
R14a	Iturin+
Plasmids	
pC194	Cm ^r
pUB110	Km ^r

1.3 プラスミドおよび染色体DNAの調製

*B. subtilis*からのプラスミドの調製はアルカリ調製法(7)によったが、リゾチームの濃度を5 mg/mlに、solution Iのグルコースをスクロース(25% (W/V))に変えて用いた。プラスミドの大量調製はアルカリ法の後、CsCl-EtBr平衡密度勾配遠心分離法により精製を行った。PC194のモノマーはアガロース電気泳動で調製したプラスミドの中からDNA PREPを用いガラス結合法で分離した。*B. subtilis*からの染色体DNAの調製はsarkosyl lysateをCsCl-EtBr平衡密度勾配遠心分離法により行った。

1.4 *B. subtilis*の形質転換

*B. subtilis*の新しい形質転換法は酵母の形質転換(8)を参考に開発を行った。L培地で37℃、一晚好気培養した菌液を1%、新しいL培地に植菌し2.5時間、37℃で振とう培養した。10 mlの培養液(菌濃度=2-5×10⁷ cells/ml)を遠心分離により集菌し、10 mlのTE緩衝液で洗浄後、10 mlのTE緩衝液に懸濁した。この1 mlを試験管(1.5φ×10.5cm)にとり、遠心分離を行い、沈澱した菌体を金属イオンを含む

1 ml の溶液に懸濁し、1 時間 3 0 °C で振とう (120 strokes/min) した。この液 0. 1 ml に T E 緩衝液に懸濁したプラスミド (約 1 μg) を加え、3 0 °C で 3 0 分静置した。次に 7 0 % ポリエチレングリコール (P E G) 6 0 0 0 を 0. 1 ml 加え、静かに混合した。1 時間 3 0 °C で静置した後、4 2 °C で 5 分加熱し、速やかに 3 0 °C で 1 0 分冷却した。4 ml の L 培地を加え、遠心分離を行った。沈澱した菌体を 2 ml の L 培地で洗浄しさらに遠心分離を行った。次に菌体を 1 ml の L 培地に懸濁し 3 7 °C で 4 時間好気培養し、遺伝子の発現を行った後、抗生物質を含む L 寒天培地に塗抹した。

比較のため行ったコンピテント法は従来の方法 (6) を用いたが、必要に応じてアミノ酸を (5-50 μg) 添加した。

1.5 その他の方法

アガロース電気泳動法は Maniatis 等の方法 (9) によった。HindIII, DNase I の使用は販売元のマニュアルに従った。

◇ 2. 研究結果と考察

2.1 *B. subtilis* のアルカリ金属カチオンによる形質転換

B. subtilis MI113 株を種々のカチオン類で処理した後、プラスミド pC194 で形質転換を行った。その結果の一部を Table 2 に示す (10)。アルカリ金属カチオンすなわち Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺ の飽和濃度で処理すると形質転換効率が著しく高いことが明らかになった。アルカリ土金属イオンは大腸菌のコンピテントセル法で有効なことが明らかになっているが本法には無効であった。また Li⁺ イオンは酵母の形質転換に有効であるが、やはり枯草菌には効果が無かった。このように形質転換された *B. subtilis* MI113 株をアルカリ抽出し細胞内にプラスミド pC194 が存在していることをアガロース電気泳動法により確認した。プラスミドを入れないかまたは金属イオンを添加しないと形質転換体は得られなかった。得られた形質転換体数はプラスミドの量に比例していた (Fig. 1)。

これらの結果を基に、以後、本方法の最適条件の検討には 4M KCl、3 0 °C、pC194 1 μg を基準に用いた。

2.2 最適条件の検討

2.2.1 温度

金属イオン処理を 3 7 °C で行ったところ、形質転換体はまったく得られなかった。従ってこのイオン処理は 3 0 °C でなければならないと判断された。

2.2.2 菌濃度

菌濃度を 1 0⁶ から 1 0⁹ (cells/ml) と変化させたところ 5 × 1 0⁷ で最大の形質転換率が得られた (Fig. 2)。この濃度以下でも以上でも効率が顕著に低下した。

2.2.3 P E G 濃度

P E G の分子量を変化させた結果を Table 3 に示す。最大の形質転換効率は P E G 6

000（形質転換溶液における濃度＝35%）で得られ、分子量1000以下では形質転換体は得られなかった。PEG6000を使用しないと形質転換が起こらないことから、PEGは必須である。PEG処理をほどこして5分後にDNase Iを加え、プラスミドDNAを分解したところ、形質転換効率に何等影響が無かった。このことはアルカリ金属イオンによって処理された菌体がこの時点ですでにプラスミドDNAを取り込んでいたことを示す。

2.2.4 DNAの形状

各種のDNAの形状に対して、従来からあるコンピテントセル法をここで開発したアルカリ金属イオン処理法と比較したのがTable 4である。KC1法ではpC194のモノマーが分離精製していないプラスミドとほぼ同じ頻度で形質転換されることが明かである。モノマーDNAはコンピテントセル法では形質転換できないことが明らかになっている。制限酵素 HindIII で切断し線状になったpC194も頻度は環状プラスミド程ではないが形質転換されたが、この事実もコンピテントセル法には無い特色である。しかし染色体DNAの形質転換はできなかった（10）。

2.2.5 他の *B. subtilis* の形質転換

コンピテントセル法で形質転換できないほかの枯草菌にこの方法を適応し一般性を検討した。*B. subtilis* IAM1026, IAM1027, IAM1107 に対して上記方法を用い形質転換を行った結果を Table 5に示す。プラスミドpC194 および pUB110 は高い頻度で形質転換されることが明らかである（10）。

2.2.6 微生物農薬Iturin生産菌の形質転換

B. subtilis NB22, UB24, YB8, R14はいずれも各種の植物病原性細菌ならびに糸状菌に抗菌活性を示し、微生物農薬として利用の期待がもたれている。これらの枯草菌の遺伝子操作系をつくりあげるために、まず外部から遺伝子の導入法を開発する必要がある。*B. subtilis* NB22についてコンピテントセル法、プロトプラスト法およびここで開発したKC1法を適用し二種類のプラスミドpC194, pUB110の形質転換を試みた結果を Table 6に示す（11）。pC194はKC1法が比較的用いた二方法より効率が良いことは明かである。特にプロトプラスト法によるとpUB110はまったく形質転換されず、またpC194は形質転換されたが、得られた形質転換体はプレート上でムコイド状を示し、計数が困難であった。KC1法ではこのような問題がなくこの方法の優位性が証明された。

B. subtilis UB24, YB8, R14a に関する形質転換頻度はそれぞれ、 2.1×10^3 , 4.0×10^3 , 1.7×10^3 (transformants per μ g DNA)とNB22と大きな差が無かった（12）。

◇結論と今後の課題

1. アルカリ金属イオンによっていままで遺伝子の形質転換できなかった枯草菌を形質転換することができるようになった。使用できるプラスミドによらずその効率も高く、

従来法に替わる第三の方法と言える。

2. DNAのモノマー、線状DNAも形質転換でき、従来法では使用できないDNAも使用可能であることが明らかになった。

3. この方法は処理が簡単かつ迅速であり、特に実用菌には有効な方法と思われる。

4. アルカリ金属イオンの中ではCs⁺は効率が高いが、有害な物質であり、K⁺、Na⁺という安価で、安全なイオンで形質転換できることは、環境問題の点からも有用である。

今後はこの形質転換法のメカニズムの解析を行い、より迅速かつ効率の良い方法に改良することが課題である。また、枯草菌以外の菌にも適用可能かどうか、その一般性を検討する。

◇ 引用文献

1. Ehrlich, S. D. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1680-1682.
2. Gryczan, T. J., Contente, S. and Dubnau, D. (1978) J. Bacteriol., 134, 318-329.
3. Chang, S. and Cohen, S. N. (1979) Mol. Gen. Genet. 168, 111-115.
4. Phae, C. G., Shoda, M. and Kubota, H. (1990) J. Ferment. Bioeng., 69, 1-7.
5. Phae, C. G., Sasaki, M., Shoda, M. and Kubota, H. (1990) Soil Sci. Plant Ntr., 36, 575-586.
6. Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J. (1961) J. Bacteriol., 81, 741-746.
7. Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) Nucl. Acids Res., 7, 1513-1523.
8. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) J. Bacteriol., 153, 163-168.
9. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y.
10. Ano, T., Kobayashi, A., and Shoda, M. (1990) Biotech. Letters, 12, 99-104.
11. Matsuno, Y., Hiraoka, H., Ano, T., and Shoda, M. (1990) FEMS Microbial. Letters 67, 227-230.
12. 人見達也：東京工業大学工学部卒業論文（1991）

Table 2. Transformation efficiency expressed as number of Cm^r transformants per μg of pCl94 DNA in the treatment of various cations.

Cations added	saturation*	Concentrations of cations		
		50% saturation	25% saturation	0.5M
LiCl	0	0	5.0×10^3	N.D.**
NaCl	3.0×10^3	1.3×10^3	0	N.D.
KCl	1.0×10^4	4.1×10^3	0	N.D.
RbCl	2.3×10^3	2.4×10^3	N.D.	N.D.
CsCl	1.0×10^4	2.1×10^3	1.0×10^3	N.D.
MgCl ₂	0	N.D.	N.D.	0
CaCl ₂	0	N.D.	N.D.	1.0×10^2
SrCl ₂	0	N.D.	N.D.	3.2×10^2
BaCl ₂	9.0×10	N.D.	N.D.	1.0×10
none	0	0	0	0

*:saturation concentration was determined at 30 °C.
 **:Not determined.

Table 3. Effect of molecular weight of PEG on transformation frequency

PEG	Average molecular weight	Transformants per $1 \mu g$ DNA	Transformation frequency (transformants per viable cell number)
20000	20000+5000	1.1×10^5	5.5×10^{-4}
6000	7500	2.5×10^5	1.8×10^{-3}
4000	2700-3400	1.8×10^4	9.4×10^{-5}
2000	2000	1.2×10^3	8.1×10^{-6}
1000	1000	0	0
600	600	0	0
200	200	0	0

Table 4. Effect of DNA configuration on transformation efficiency expressed as number of transformants per 1 µg DNA in two methods

DNA	This method	Competent cell method	Selected markers
Unfractionated pC194	5.8×10^4	6.4×10^3	Cm^r
Monomeric pC194	8.6×10^4	0	Cm^r
Linear pC194	1.2×10^3	0	Cm^r
Chromosomal DNA of <u>B. subtilis</u> MI115	0	1.0×10^4 ^a	<u>trp</u> ⁺
	0	7.4×10^4 ^b	<u>arg</u> ⁺
Chromosomal DNA of <u>B. subtilis</u> 168	0	8.5×10^4 ^c	<u>arg</u> ⁺

Minimal medium was supplemented with amino acids (50 µg/ml each), arginine+leucine(a), tryptophan +leucine (b) and tryptophan(c), respectively.

Table 5. Transformation of different B. subtilis with plasmids pC194 and pUB110 in two methods.

Required strain	This method		Competent cell method	
	pC194	pUB110	pC194	pUB110
<u>B. subtilis</u>				
MI113	1.4×10^4 [*] (3.3×10^{-3}) ^{**}	1.9×10^2 (2.5×10^{-5})	6.4×10^3 (3.2×10^{-5})	2.1×10^4
IAMI026	2.4×10^4 (1.6×10^{-4})	3.1×10^3 (2.1×10^{-5})	0	0
IAMI027	1.4×10^5 (7.4×10^{-4})	1.8×10^4 (1.0×10^{-4})	0	0
IAMI107	5.6×10^3 (7.0×10^{-4})	4.7×10^2 (5.9×10^{-5})	0	0

*:transformation efficiency(number of transformants per µg of plasmid DNA)

** :transformation frequency(transformants per viable cells)

Table 6.
Results of transformation of *B. subtilis* with plasmid by three different methods

Plasmid	Competent cell method		Protoplast method		KCl treatment method	
	Transformants per μg of DNA	Transformation frequency	Number of transformants in 1 ml of medium ^a	Transformation frequency per regenerant	Transformants per μg of DNA	Transformation frequency
PC194	4.3 ± 10	2.3 ± 10^{-7}	3.8 ± 10	3.5 ± 10^{-6}	4.1 ± 10^3	3.3 ± 10^{-3}
PUB110	2.0 ± 10^2	1.1 ± 10^{-6}	< 10	$< 9.2 \pm 10^7$	1.5 ± 10^3	7.2 ± 10^{-4}

^a 10 μg of plasmid DNA was added into the transformation reaction mixture.

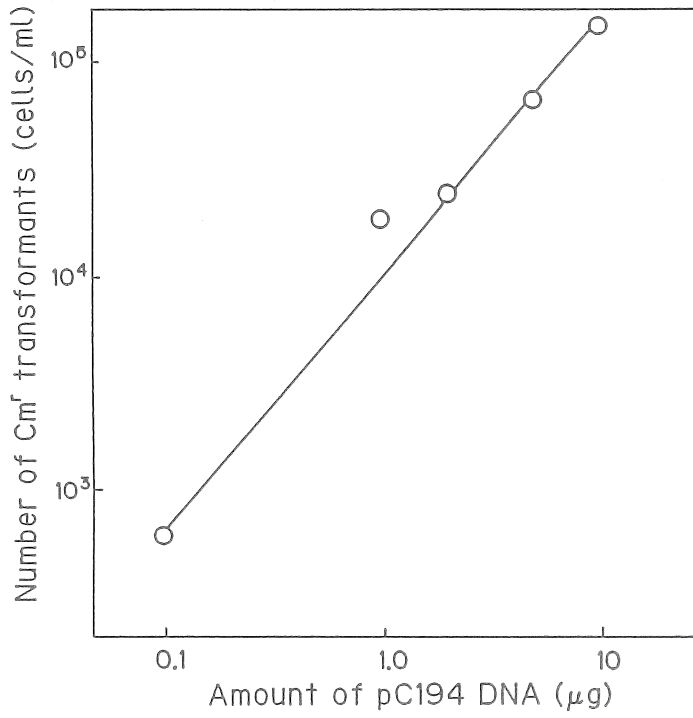


Fig. 1. Relationship between amount of DNA and number of transformants.

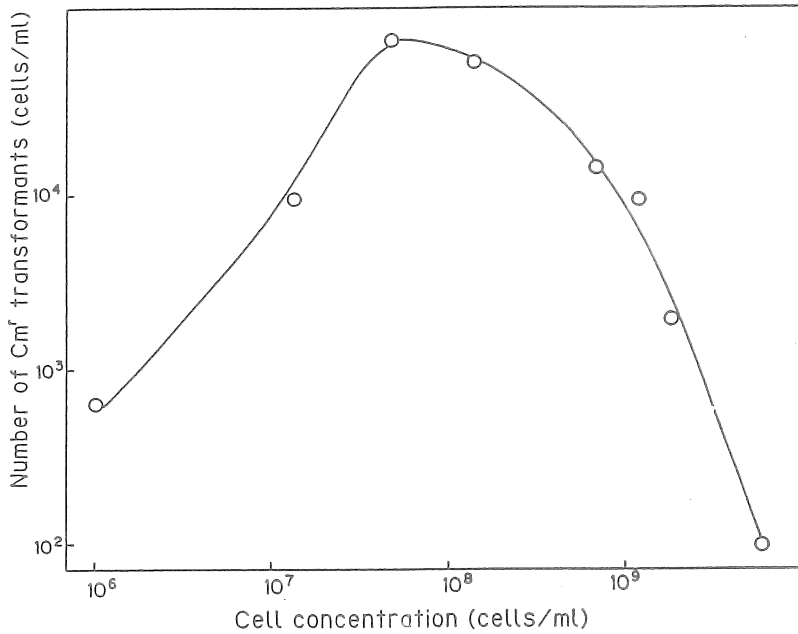


Fig. 2. Relationship between cell concentration and number of transformants.

A new transformation method of microorganisms with plasmid by alkali metal ions like K^+ and Na^+

MAKOTO SHODA AND TAKASHI ANO

Research Laboratory of Resources Utilization
Tokyo Institute of Technology

Summary

As transformation methods of microorganisms with plasmid DNA, two conventional methods have been popularly used, namely a competent cell method and a protoplast method. Each of these has its own advantages and disadvantages. We have isolated a bacterium, Bacillus subtilis which show a remarkable suppressive effect to phytopathogens. When we conducted the genetic analysis and genetic manipulation of the bacterium by applying the two methods, no transformation occurred. Then, we developed a new method which is applicable to the bacterium by using alkali metal ions like K^+ and Na^+ .

The transformation treatment is briefly described as follows. The cells of B. subtilis were cultivated in L broth at 37 ° C overnight and the culture broth was centrifuged, followed by washing the precipitated cells with TE buffer. One ml of the suspension was mixed with various ion solutions and shaken at 30° C for 3 min. The solution of plasmids with different configurations was added and the mixture was stood still for 30 min. Then, 0.1 ml of polyethylene glycol(PEG)6000 solution was introduced into the mixture and gently mixed. After heating the solution at 42° C for 5 min, quick cooling at 30 ° C was carried out. Then, the solution was incubated at 37 ° C for 4 h for gene expression, and 0.1 ml of solution was spread onto L agar plates containing antibiotics as a genetic marker.

Among the ions tested, saturated solutions of alkali metal ions like K^+ and Na^+ showed a significantly high transformation frequency. The features of the new transformation are as follows. The optimal values of temperature; 30° C, cell concentration; 5×10^7 (cells/ml) and PEG; 6000. The monomer and linear plasmids were efficiently transformed, which were impossible in the methods described above. This new method is easy to handle, safe and practical in the transformation of bacteria of which competency was hard to obtain.