

9122 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>イオンによる新しい細胞融合法の開発

正田 誠(東京工業大学)

研究目的

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。これらの菌には、従来の遺伝子操作法が適用できないことからK<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>を用いた新しい遺伝子導入法の開発を行い成功した。その有効性を広げることと操作性を良くするために、操作の簡略化と最適化をメカニズムの解明と共に行うことを目的とした。

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種のほか他の*Bacillus*属細菌4種である。プラスミドは pC194(Cm<sup>r</sup>)を用いた。枯草菌の迅速形質転換は、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時間振盪培養した。0.4mlの培養液を1.5ml容ポリプロピレン製微量遠心チューブに移し、10,000 x g、2分間遠心集菌した。410mMのKC1水溶液1mlに懸濁し、30℃、45分間静置した。菌体懸濁液50μlをプラスミドDNA(5μl以下)と混合後、70%ポリエチレングリコール(PEG)6000水溶液を50μl添加した。1mlのLC溶液を添加後遠心分離を行った。沈澱した菌体を1mlのL培地に懸濁し37℃で2時間静置培養し、遺伝子発現を行った後、抗生物質を含むL寒天培地に塗抹した。

細胞の溶菌活性は、形質転換実験に準じて培養を行った細胞を、KC1溶液に懸濁後650nmでの濁度の減少を指標として30℃にて測定した。

融合株の検出は、異なった遺伝子マーカーを有する2種類の菌株を混合後、迅速形質転換法に準じてKC1処理およびPEG処理を行った後に、いずれの菌株も増殖できない選択培地上に塗布する事により行った。

研究結果と考察

アルカリ金属カチオンによる形質転換法の簡略・最適化を行ったところ、約30分程度で操作が完了する迅速法が開発された。この方法は標準菌株の他、微生物農薬として期待がもたれている枯草菌や他の*Bacillus*属細菌にも適用可能であった。さらにはこれらグラム陽性細菌ばかりでなくグラム陰性細菌である大腸菌にまで形質転換が可能であった。形質転換のメカニズムとしては、カチオンの作用や自己溶菌酵素欠損株の解析から、プロトプラスト化を経ない細胞融合反応によるものと考えられた。実際に融合株の検出を試みたところ、元株とは異なる種々の遺伝背景を示すコロニーが多数取得された。このことから、プロトプラスト化やその再生が困難な有用微生物の、簡便かつ迅速な新しい育種法として今後の有効利用が期待される。



9122 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>イオンによる新しい細胞融合法の開発

正田 誠(東京工業大学)

## ◇研究の目的

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（1、2）。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、従来までに知られている方法を適用したが形質転換が起こらないため、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>を用いた新しい遺伝子導入法の開発研究を行ってきた（3、4）。その有効性はほぼ実証できたが、この形質転換は操作が5時間以上かかるため、操作の簡略化と形質転換の最適化が期待された。またこの方法がなぜ有効なのかというメカニズムについては不明である。

細胞に外部から遺伝子を導入しようとする①形質転換法（コンピテントセル法）と②細胞融合法（プロトプラスト法）のどちらかを用いる。①と②の方法はそれぞれ独特の処理を行い、また導入される遺伝子の大きさ、種類が違うのでまったく異なった方法という認識が常識であった。特に②の方法は先ず細胞壁を溶かしプロトプラストという特殊な細胞にした後、細胞同志をポリエチレングリコール（PEG）の存在下で接触させ細胞を融合させる。その後、再生培地という極めて複雑な培地で3～4日かけて遺伝子の入った細胞を選択する。

我々が実施した研究は当初①の形質転換法のメカニズムで、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>が作用して遺伝子が導入されるという仮定で行っていたが、その後実験データが蓄積するに従ってむしろ②の細胞融合に近いと考えた方が良いという意外な事実が明らかになってきたため、この部分を中心にメカニズムの研究を行うことを目的とした。

## ◇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10g、酵母エキス5g、NaCl 5g、を蒸留水1リットル（pH=7.2）に溶解した。

L寒天培地：L培地に15gの寒天を添加した。

LC溶液：L培地に100mM CaCl<sub>2</sub>を添加した。

Spizizenの最少培地：（5）の論文を参照して用いた。

これらの培地に必要に応じてアミノ酸（50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）添加した。

抗生物質クロラムフェニコール（Cm）は5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で各培地に添加した。

### 1.3 プラスミドDNAの検出および調製

*B. subtilis* からのプラスミドの調製はアルカリ抽出法（6）に従ったが、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））に変えて行った。プラスミドの大量調製はアルカリ法の後、CsCl-EtBr平衡密度勾配超遠心分離法により行った。

### 1.4 枯草菌の迅速形質転換法

枯草菌の迅速形質転換法は、アルカリ金属塩による枯草菌の形質転換法（3）を *B. subtilis* MI113 とプラスミド pC194 を用いて最適化することにより開発した。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時間振盪培養した。0.4 mlの培養液を1.5 ml容ポリプロピレン製微量遠心チューブに移し、10,000 x g、2分間遠心集菌した。410 mMのKCl水溶液1 mlに懸濁し、30℃、45分間静置した。菌体懸濁液50  $\mu\text{l}$ をプラスミドDNA（5  $\mu\text{l}$ 以下）と混合後、70%ポリエチレングリコール（PEG）6000水溶液を50  $\mu\text{l}$ 添加した。1 mlのLC溶液を添加後遠心分離を行った。沈澱した菌体を1 mlのL培地に懸濁し37℃で2時間静置培養し、遺伝子発現を行った後抗生物質を含むL寒天培地に塗抹した。

### 1.5 細胞溶菌活性の測定

KCl溶液中での細胞の溶菌活性はSvarachorn等（7）に従い650 nmでの濁度の減少を指標として30℃にて測定した。

### 1.6 細胞融合株の検出

融合株の検出は、異なった遺伝子マーカーを有する2種類の菌株を混合後、迅速形質転換法に準じてKCl処理およびPEG処理を行った後に、いずれの菌株も増殖できない選択培地上に塗布する事により行った。

### 1.7 その他の方法

アガロースゲル電気泳動はSambrook等の方法（8）によった。

## ◇ 2. 研究結果

### 2.1 枯草菌の迅速形質転換法の開発

抗生物質を生産する野生株にも適用可能なアルカリ金属塩による形質転換法（3）は、以下の10段階からなる。(i)細胞の集菌、(ii)細胞の洗浄、(iii)アルカリ金属カチオン処理、(iv)プラスミドDNAの添加、(v)プラスミドと菌体の接触、(vi)PEGの添加、(vii)30℃でのPEG処理、(viii)42℃での熱処理、(ix)PEGの希釈および洗浄、

(x)遺伝子発現。ステップ(i)～(xi)までを行うのに5～6時間必要とするため、操作の簡略化を行い時間の短縮を試みるとともに最適化を行った。先ず、遠心・洗浄操作を短縮するためポリプロピレン製の微量遠心チューブをガラス試験管に替わり採用した。またステップ(i)の洗浄および(v)、(vii)、(viii)の時間は省略しても形質転換効率に影響を及ぼさないことが予備的検討の過程において判明した。以下の最適化実験はこの条件下において行った。

## 2.2 最適条件の検討

### 2.2.1 KCl濃度

アルカリカチオンの中において $K^+$ と $Cs^+$ は他の $Li^+$ 、 $Na^+$ 、 $Rb^+$ よりもより効果的に形質転換体を生じた。KClとCsClの形質転換効率が同程度であることから、価格と安全性を考慮にいてKClによる最適化実験を行った。最大の形質転換効率は410 mM KClにおいて得られた(Fig. 1)。

### 2.2.2 KCl処理時間

KCl処理時間について検討を行ったところ45分までほぼ直線的に形質転換体は増加した(Fig. 2)。プラスミドpC194を添加しないと形質転換体を生じないこと、また生じた薬剤耐性株から形質転換に用いたpC194と同じ分子量を有するプラスミドが回収されることは別途確認した(データ示さず)。KCl処理中15分の時点でDNA1  $\mu$ gあたり数百の形質転換体が生じていることは、時間の短縮を優先する場合処理時間が数分でも形質転換体を生じることを意味しているため興味深い。

### 2.2.3 菌濃度

菌濃度を集菌時の濃度を1として0.1から10まで変化させたところ、菌濃度0.33において最大の形質転換効率が得られた(Fig. 3)。この濃度以下でも以上でも効率が顕著に低下した。

### 2.2.4 二価カチオンの影響

MgCl<sub>2</sub>あるいはCaCl<sub>2</sub>をPEG希釈液の中に添加したところ、形質転換効率が約10倍上昇した(9)。しかしこれら二価カチオンをPEG添加直前に加えると逆に形質転換を顕著に阻害することが認められた(Table 2)。この現象については自己溶菌酵素の活性化と関連して後に考察する。

## 2.3 自己溶菌酵素欠損株の形質転換

この形質転換法はアルカリ金属塩に依存している。一方、アルカリ金属塩により枯草菌の自己溶菌酵素が活性化されることが知られている(7、10)。そこでアルカリ金属塩による形質転換法と自己溶菌酵素の活性化との関係について調べるために、自己溶菌酵素欠損株FJ2(N-acetylmuramyl-L-alanine amidase, endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase両酵素欠損株)(11)を親株であるMarburg 168株と同一の条件下において形質転換を行った。その結果 Table 3 に示す様に本培養後の濁度は共に充分であったが、

168株が効率よく形質転換されたのに対し、FJ2株では全く形質転換体が得られなかった。このことから、アルカリ金属イオンによる形質転換において、自己溶菌酵素が重要な役割を果たしていることが示された。

#### 2.4 自己溶菌活性と形質転換能の関係

自己溶菌酵素活性と形質転換能の関係を調べるため、形質転換条件下における溶菌を650nmの濁度の減少により測定した。形質転換の条件下において培養したMI113株の菌体を4100mM、410mM、103mMの各KC1水溶液に懸濁し濁度を経時的に調べた(9)。その結果 Fig. 4-1 に示す様に、溶菌は410mMの時に最もよく起こり、次いで4100mM、103mMの順であった。しかし、蒸留水に菌体を懸濁した場合は全く吸光度の変化は観察されなかった(データ示さず)。形質転換効率と生菌数の関係は Fig. 4-2 に示すように、溶菌が起こりやすいほど(410mM>4100mM>103mM)生菌数が少なくなり(410mM<4100mM<103mM)、形質転換効率は高くなる(410mM>4100mM>103mM)ことが判明し溶菌活性と形質転換効率の関係がこの実験からも示唆された。410mMにおけるKC1の処理時間は45分が最適である(Fig. 2)が、この時間は、ほぼ溶菌反応が停止する直前であることがわかる(Fig. 4-1)。

またKC1を蒸留水ではなくL培地に溶解したところ全く形質転換体は生じなかった(データ示さず)。

#### 2.5 他の菌への応用

アルカリ金属イオンと自己溶菌酵素の活性化および形質転換能の三者に密接な関係があることが示された。また自己溶菌酵素は細胞分裂時に必要なためほぼ普遍的に存在すると考えられている。したがって開発された迅速形質転換法が広く他の菌株にも適応可能であると考えられたため検討を行った。その結果ペプチド性抗生物質生産菌 *B. subtilis* NB22、RB14、UB24、YB8 において適用可能であった。また *B. pumilus* W20、*B. megaterium* 216(A)という種を異にする菌株にも適用可能であった。しかし好熱性細菌である *Bacillus stearothermophilus* CU21 や *Bacillus brevis* NAGANO においては種々検討を行ったが形質転換体は得られなかった。

#### 2.6 細胞融合株の検出

アミノ酸要求性の異なる *B. subtilis* MI113 (arg<sup>-</sup> trp<sup>-</sup>) および *B. subtilis* MI115 (leu<sup>-</sup>)をそれぞれ培養後、混合状態でKC1処理を行いPEG処理を行った。MI113にはプラスミドpC194を予め導入しておき、抗生物質耐性の上でも両菌株の差が認められるようにしておいた。遺伝子発現の後に蒸留水に懸濁し、最少培地(M)にロイシン(L)およびCmを含有するMLCmプレートに塗抹した。結果は Table 4 に示すようにMI113(pC194)やMI115単独の時はコロニーが得られないが、両菌株を混ぜ合わせてPEG処理したときは、MI115のアミノ酸要求性とクロラムフェニコール耐性を持ったコロニーが出現した。ここで得られたコロニーを、MCmプレートにレプリカした。その結

果、各混合比率からアミノ酸要求性を有しないコロニーが得られた (Table 5)。元の菌株は共にアミノ酸要求性が付いていることから、細胞融合が生じていることが示唆された。

またこれらの最少培地上で増殖可能な融合株の中には、 $0.02 \text{ ppm}$ のアルギニン を培地に添加するだけでその増殖が著しく阻害されるという元株とは全く異なる性質を有するものも含まれていた。新しい微生物の増殖制御因子としても興味ある現象である。

### ◇3. 考察

本研究においてアルカリ金属形質転換法の簡略および最適化を行ったところ、集菌から遺伝子発現に入るまでの時間が30から50分以内と元法の5から6時間と比べて大幅に短縮された。

形質転換のメカニズムとして自己溶菌酵素の活性化が以下に述べる理由から考えられた。(i)形質転換も溶菌活性も一価カチオン ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ) により誘起される。(ii)炭素源、窒素源などの栄養源存在下では溶菌は認められない (12, 13)。またL培地中でKC1処理を行っても形質転換体は生じない。(iii)溶菌活性は対数増殖中最も活性が高い (10, 14)。またこの時期に形質転換効率も高くなる。(iv)KC1中溶菌活性が最も高いときに、形質転換効率も最大となった (Figs. 4-1, 4-2)。(v)溶菌酵素は一価カチオンの濃度により著しい影響を受ける (7, 10)。また形質転換効率もKC1の濃度依存性を示した。(vi)溶菌酵素欠損株FJ2は本形質転換法では形質転換できなかった (Table 2)。(vii)カルシウムやマグネシウムの様な二価カチオンをPEG希釈液中に添加すると形質転換体は約10倍に増加したが、PEG処理直前に添加した場合は著しい形質転換の阻害を引き起こした (Table 2)。枯草菌内で溶菌活性が引き起こされた後でも、これら二価カチオンは即座に溶菌を停止する事から (7)、付加的な溶菌活性を阻害することにより細胞の死滅を防ぐために形質転換効率上昇するものと考えられる。以上のことから本形質転換法は自己溶菌酵素の活性化と深く関係していると考えられる。

形質転換のメカニズムとしては、アルカリカチオン (例えば $\text{K}^+$ ) により活性化された自己溶菌酵素により細胞壁上に局所的な傷 (小孔) が生じ、PEG処理によりこの小孔を通じてプラスミドDNAの取り込みが起これ、遺伝子発現中に細胞壁の修復も行われるため形質転換体が生じると考えられる。従って細胞壁を完全に除去するプロトプラスト法とは異なり浸透圧調整培地は必要としないが、局所的にはPEGの作用による細胞融合が起こっていると考えられる。実際、異なる遺伝子マーカーを有する2菌株を同条件下で反応したところ元のいずれの菌株とも異なる表現型を示すコロニーが多数生じたことから細胞融合が起こっているものと考えられた。プロトプラストを作製することなく細胞融合株が得られるとすればプロトプラスト化とその再生が困難な、産業上有用な種々の菌株に対してこの方法が適用できることになり、非常に有用な反応であると考え

られる。

このアルカリ金属塩による迅速形質転換法を種々の菌株へ適用したところ、イチュリン生産性 *B. subtilis* の他、*B. pumilus* W20 や *B. megaterium* 216(A) においても形質転換体を得られた。また、これらグラム陽性細菌のみならずグラム陰性細菌である大腸菌 *Escherichia coli* においても適用可能であることを我々は別途確認している(15)。従って、本形質転換法は幅広い菌株に適用できる形質転換法であると考えられる。

#### ◇結論と今後の課題

1. アルカリ金属イオンによる形質転換法の簡略・最適化を図ったところ、約30分程度で操作が終了する枯草菌としてはもっとも迅速な形質転換法の開発に成功した。
2. 通常用いられるMarburg株の他、抗生物質生産菌や他の*Bacillus*属細菌にも広く適用可能であることが示された。
3. 形質転換のメカニズムとして、菌の持つ自己溶菌酵素の活性化が深く関与していることが、自己溶菌酵素欠損株の形質転換やKC1水溶液中における溶菌活性の測定等のデータから示された。
4. 自己溶菌酵素の活性化によりプロトプラスト化を経ない細胞融合が起こっていることが考えられた。異なる遺伝子マーカーを持つ二種の菌株を処理したところ実際に融合株の性質を示すコロニーが多数得られた。この結果は、新しい細胞育種の上からも非常に重要であると考えられる。

今後はこのプロトプラスト化を経ない細胞融合法の最適化を行い、メカニズムのより詳細な解析と共に種々の有用微生物への適用を試み、新しい微生物育種の方法として確立することが今後の課題である。

#### ◇引用文献

1. Phae, C. G., Shoda, M. and Kubota, H. (1990) *J. Ferment. Bioeng.*, 69, 1-7.
2. Phae, C. G., Sasaki, M., Shoda, M. and Kubota, H. (1990) *Soil Sci. Plant Ntr.*, 36, 575-586.
3. Ano, T., Kobayashi, A., and Shoda, M. (1990) *Biotech. Lett.*, 12, 99-104.
4. Matsuno, Y., Hiraoka, H., Ano, T., and Shoda, M. (1990) *FEMS Microbiol. Lett.*, 67, 227-230.
5. Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J. (1961) *J. Bacteriol.*, 81, 741-746.
6. Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) *Nucl. Acids Res.*, 7, 1513-1523.
7. Svarachorn, A., Shinmyo, A., Tsuchido, T., and Takano, M. (1989) *Appl.*



- Microbiol. Biotech., 30, 299-304.
8. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
9. Hiraoka, H., Ano, T., and Shoda, M. (1992) Appl. Microbiol. Biotech., (accepted).
10. Young, F. E. (1966) J. Biol. Chem., 241, 3462-3467.
11. Fein, J. E. and Rogers, H. J. (1976) J. Bacteriol., 127, 1427-1442.
12. Jolliffe, L. K., Doyle, R. J., and Streips, U. N. (1981) Cell, 25, 753-763.
13. Svarachorn, A., Shinmyo, A., Tsuchido, T., and Takano, M. (1989) J. Ferment. Bioeng., 68, 252-256.
14. Hobot, J. A. and Rogers, H. J. (1991) J. Bacteriol., 173, 961-967.
15. Ano, T. and Shoda, M. (1992) Biosci. Biotech. Biochem., (accepted).

Table 1. Bacterial strains and plasmid used.

	Characteristics
<i>B. subtilis</i> M1113	<i>arg-15 trpC2 hsmM hsrM</i>
M1115	<i>leuC7 recE4</i>
168	<i>trpC2</i>
FJ2	<i>trpC2 lyt</i>
NB22	Iturin <sup>+</sup>
RB14	Iturin <sup>+</sup>
UB24	Iturin <sup>+</sup>
YB8	Iturin <sup>+</sup>
<i>B. pumilus</i> W20	<i>ade</i>
<i>B. megaterium</i> 216(A)	Sm <sup>r</sup>
<i>B. stearothermophilus</i> CU21	Sm <sup>r</sup>
<i>B. brevis</i> NAGANO	Gramicidin S <sup>+</sup>
Plasmid	
pC194	Cm <sup>r</sup>

Table 2. Effect of divalent cations on transformation.

Added cations	Time added	Number of transformants (transformants/ml)
MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	Before PEG treatment	40
	After PEG treatment	6,130
CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	Before PEG treatment	0
	After PEG treatment	10,800
None		860

Table 3. Transformation of *B. subtilis* FJ2 deficient in autolytic enzymes.

	<i>B. subtilis</i> 168 (parental strain)	<i>B. subtilis</i> FJ2 (mutant of 168)
OD <sub>660</sub> at the end of main culture	0.43	0.65
Number of transformants (cells/ml)	2,200	0

Table 4. Effect of the transformation treatment on the cultures mixed

Volume of culture mixed ( $\mu$ l)	Number of colonies appeared on the MLCm plates PEG dilution with	
	L medium	LC medium
MI113(pC194) - MI115		
0 - 800	0	0
400 - 0	0	0
20 - 760	675	586
100 - 600	115	29
200 - 400	19	21

Table 5. Prototrophic growth of the colonies appeared on the MLCm plates described in Table 4.

Mixed ratio	Number of colonies tested	Growth on the MCM plates	
		growth	no-growth
20 - 760	50	5	45
100 - 600	32	7	25
200 - 400	18	3	15

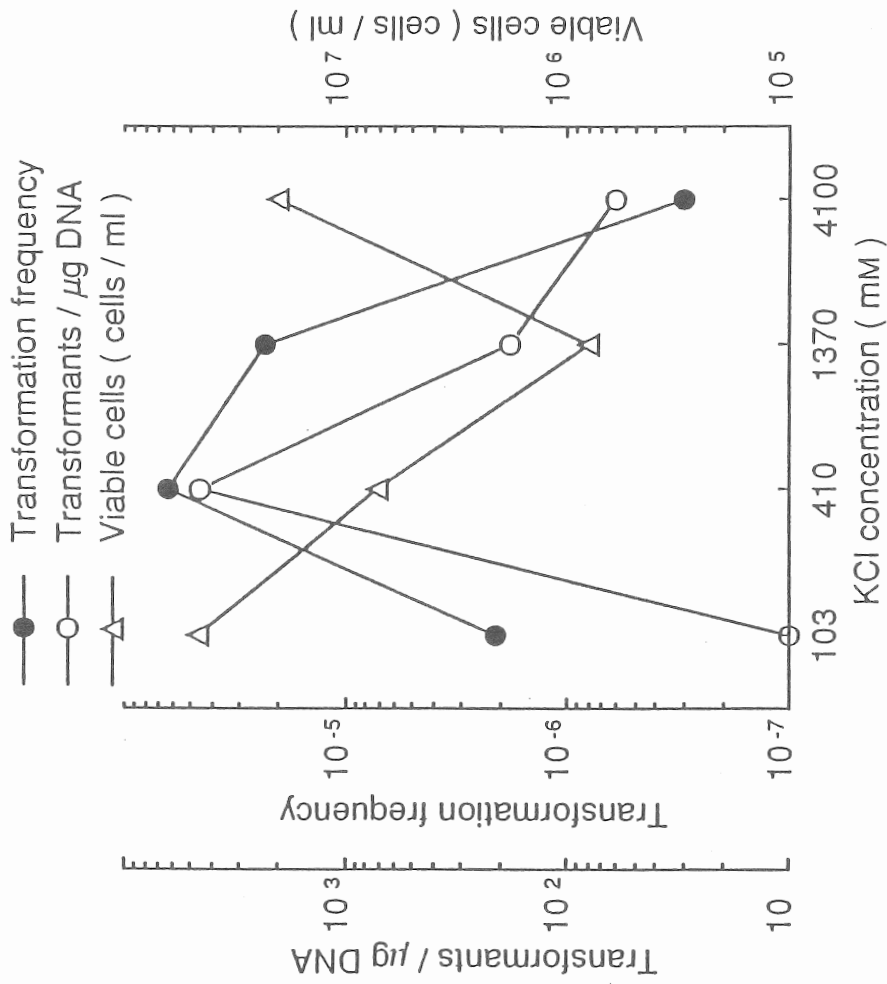


Fig. 1. Effect of KCl concentration on transformation. Cells were treated with each KCl solution and transformed by pC194 as described in materials and methods section.

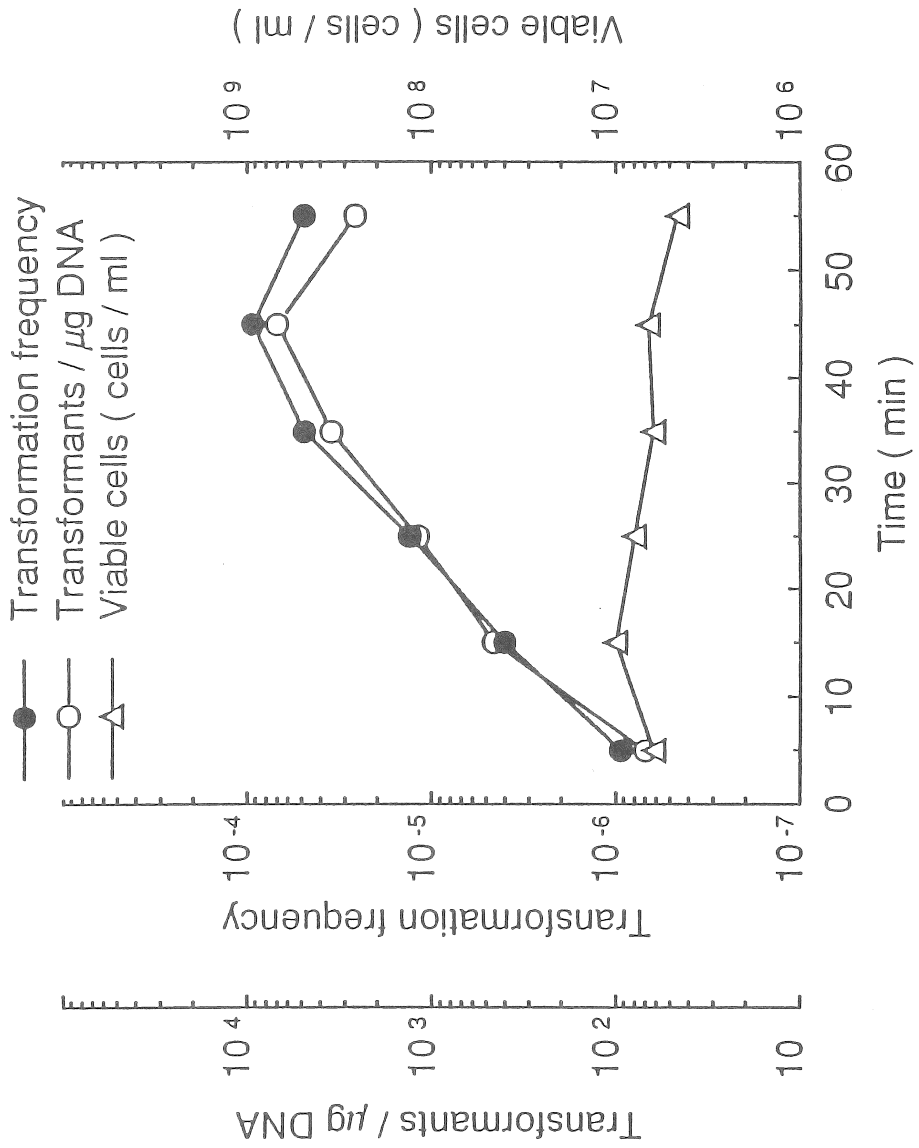


Fig. 2. Effect of incubation time in KCl solution on transformation.

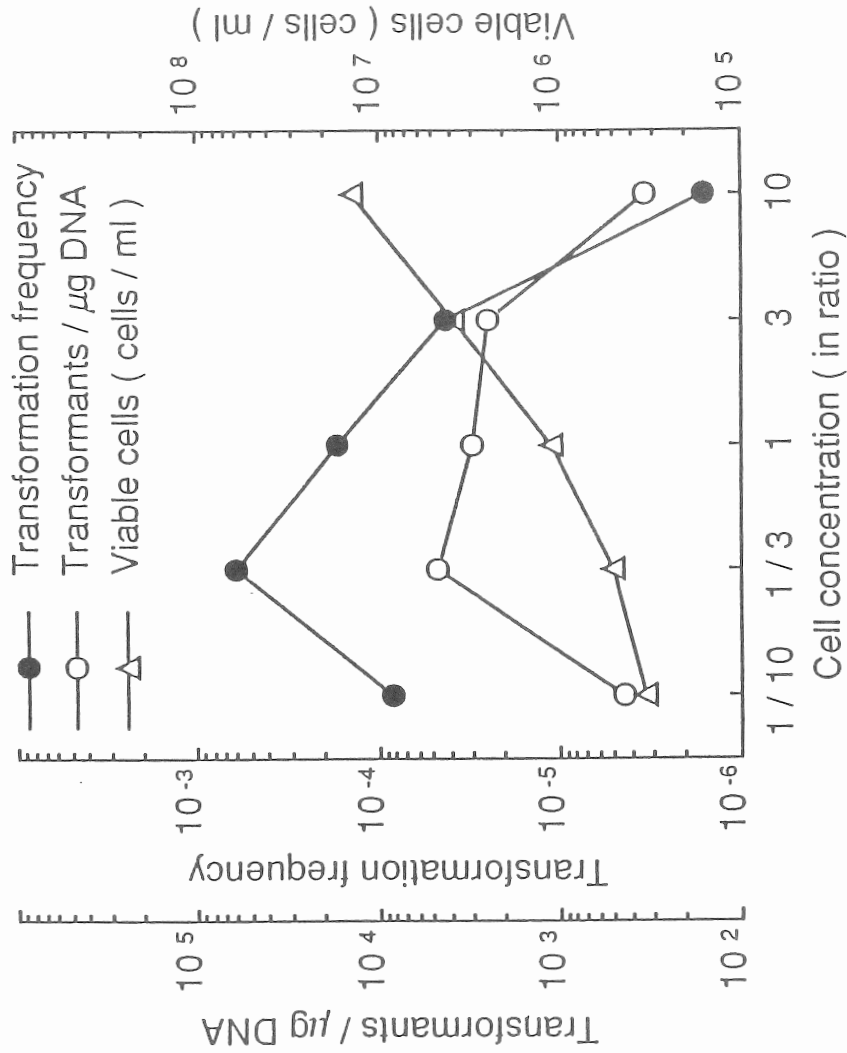


Fig. 3. Effect of cell concentration on transformation. Cells collected from culture broth were diluted or condensed in KCl solution. The cell density at harvest time was taken as one in ratio.

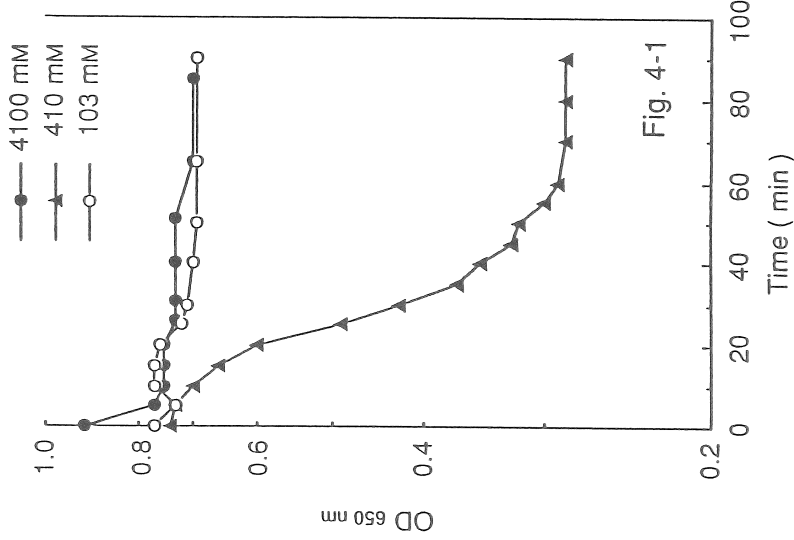


Fig. 4-1. Autolysis of *Bacillus subtilis* MI113 in different concentration of KCl solutions. Cells were harvested in the middle to late exponential growth phase, and were suspended in KCl solutions. Incubation was carried out at 30 °C and change of optical density (OD<sub>650</sub>) was followed.

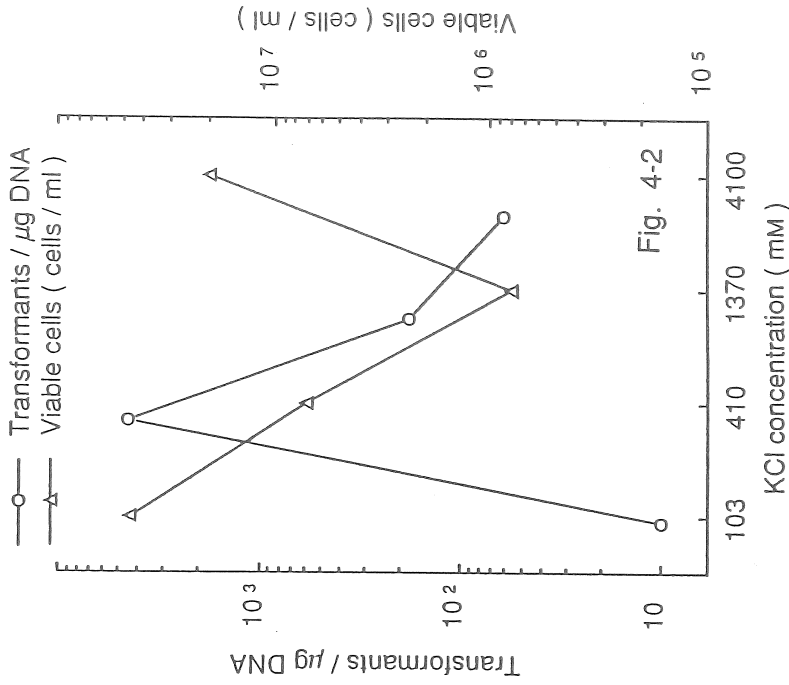


Fig. 4-2. Effect of KCl concentration on transformation and viable cells.

A new rapid and micro cell fusion method by alkali metal ions  
like  $K^+$  and  $Na^+$

MAKOTO SHODA AND TAKASHI ANO

Research Laboratory of Resources Utilization  
Tokyo Institute of Technology

#### Summary

Since no transformation occurred by two conventional methods to a newly-isolated *Bacillus subtilis* which shows a broad suppressive spectrum to phytopathogens, we have developed a new transformation method by using alkali metal ions like  $K^+$  and  $Na^+$ . We have simplified the procedure of this method and also analysed the mechanism of this new method.

The transformation treatment is briefly described as follows. 0.33 ml culture of *B. subtilis* grown in fresh L medium was transferred into polypropylene tube, pelleted by centrifugation and resuspended in 1ml of 410 mM KCl solution. An aliquot of this suspension (50  $\mu$ l) was mixed with plasmid DNA (less than 5  $\mu$ l), and then 50  $\mu$ l of 70% PEG solution was added to this mixture. After PEG solution was diluted by the addition of 1 ml of LC medium, the cells were pelleted, resuspended in L medium and kept statically for 2h at 37°C for the expression, followed by being spread onto plates containing the antibiotic. Autolysis of whole cells in KCl solutions at 30°C was measured by monitoring the turbidity at 650 nm. Cell fusants were selected on the plates on which neither of the strains could grow because of their different genetic markers.

Simple and quick method for transformation of *B. subtilis* by plasmid DNA was developed. About 30 min was enough to complete the all steps before gene expression stage and several thousands of transformants were obtained from one  $\mu$ g of plamid DNA. The activation of autolysin(s) of the cells was strongly suggested to be involved in the mechanisms of this transformation. Colonies which expressed the completely different phenotype from that of parental strains were obtained at high frequency by this method, and cell fusions without protoplasting were considered to be the possible mechanism for this transformation. Applicatiuon of this new rapid and micro method to the industrially useful microorganisms will be promising.