納豆菌の細胞融合

—コロニーカウントによる融合の証明—

岡田憲幸*・新国佐幸**・真鍋 勝**

Cell Fusion between Miura Strain and Takahashi
Strain of *Bacillus natto*

—Proof of Fusion by Plate-Count Method—

Noriyuki OKADA*, Sayuki NIKKUNI** and Masaru MANABE**

* Tropical Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture, Forestry
and Fisheries, 1-2, Ohwashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305** National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry
and Fisheries, 2-1-2, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305

Cell fusion was examined using commercial Natto bacteria. An important point is the discrimination of fusants. Following results were obtained; (1) the optimum tonicity for protoplast regeneration (PR) of *Bacillus* was 0.2 M, less than half as the ordinary methods, (2) PR is limited when amino acid-negative mutants were used because of the limitation of casamino acids (CA) content, and (3) an easy plate-count method, namely plating directly in hypertonic media, was possible. Based on above results, nucleic acid-negative mutants (NNM) not affected by CA, and a new protoplast reversion medium containing a low content of sodium succinate, a sufficient amount of CA and a little biotine as well as polyvinylpyrrolidone, were employed. The frequency of back mutation of NNM of Natto bacteria was 10^{-6} level by the Miura strain with an adenine marker and 10^{-5} level by the Takahashi strain with an uracil marker. Their PR occurred efficiently by the easy plate-count method. The cell fusion between them was shown by giving five proofs in one series of experiments; protoplast formation, its reversion, check of back mutation, control number of fusion and fusant number. The fusion frequency was approximately 0.02%. (Received Dec 6, 1990)

細胞融合法の長所は遺伝学的に解明されていない実用株にも応用可能という点にある。融合することが分かれば、実用株の特性などを調べたうえ、将来納豆菌の改良に利用されることが期待される。既報¹⁾で、カザミノ酸濃度との関連で高張剤濃度を検討したところ、高張剤濃度を従来の半分以下、すなわち 0.5 M から 0.2 M に低下させることにより、アミノ酸マーカーを有する変異株で、融合株を識別できることを明らかにした。高張剤濃度が影響するのは、一般にかびや酵母と異なり、もともとバクテリアは低水分活性に弱いので、従来の再生培

地の高張剤濃度 (0.5 M, 水分活性値 0.9912) にマーカー発現可能な低栄養条件が加わると、その濃度が低水分活性として影響を与えるためである。しかし、コロニー出現率やプロトプラスト再生率はなお低率であった。この理由はアミノ酸マーカー発現のため、カザミノ酸を 1 mg/l に制限せざるを得ないためで、アミノ酸マーカーを用いた場合の限界といえる。この点に関して、カザミノ酸に影響されない核酸塩基マーカーを持つ変異株で、カザミノ酸を十分添加し行えば、低濃度こはく酸ナトリウム (0.2 M, 水分活性値 0.9964) との併用で、コロニ

* 農林水産省熱帯農業研究センター研究第1部 (〒305 茨城県つくば市大わし 1-2)

** 農林水産省食品総合研究所応用微生物部 (〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

ー出現率100%, プロトプラスト化後のコロニー出現率は100%を越えるほどの好条件で, 融合株が識別できることが示された²⁾. さらに, 再生は, 従来行われてきた重層法や塗抹法に換え, 簡便な混釈法で精度よく行えることが示された³⁾. 従来再生が塗抹法で行われたのは, 再生と融合株の識別が1段階でできなかったため, 栄養分豊かな培地表面上で再生し, それを最少培地に転写し融合株を識別するためであるが, 直接融合株を検出できる本法ではその必要がなく, 多数のシャーレを短時間でこなせる簡便法で十分間に合うということである. これらの成果をもとに実用株納豆菌で細胞融合を行った. 実用株を用いた融合では, 高橋納豆菌 (*B. natto*) とビタミン B-12 生産菌 (*B. megaterium*) 間で, ビタミン B-12 高生産性納豆菌を形成したとする報告⁴⁾がある. これはアミノ酸要求株すなわち染色体に遺伝マーカーを付けたもので行われた. しかし融合を実証するデータは示されていない. 染色体に遺伝マーカーを付した場合, すでに述べたように²⁾, 融合の第1段階は並行実験による次の5項目で実証すべきであろう. すなわち, 2つの供試集団について, ①溶菌酵素処理でコロニーが出現しなくなる (プロトプラストの形成), ②高張の再生培地で出現すること (プロトプラストの再生), ③マーカー成分添加で出現し, 無添加で出現しないこと (復帰変異試験), ④マーカー成分無添加で, 単に混合したのみでは出現しないこと (融合の対照試験), ⑤マーカー成分無添加で, 融合処理後出現すること (融合体の検出). 今回, 三浦菌と高橋菌の間で, 実証すべき上記5項目により, 融合の第1段階を確認したので報告する.

実験方法

1. 供試菌

三浦菌 (食総研微生物利用第3研究室より分譲, ONM-1⁵⁾) および高橋2号菌 (関西大学工学部栄養化学研究室より分譲, アルギニン要求変異株⁴⁾の原株) をそれぞれ親株とする核酸塩基要求変異株を作出供試した.

2. 培地

最少培地は, 1 l 当りグルコース 5 g, 硫酸 2 g, K_2HPO_4 3.5 g, KH_2PO_4 1.5 g, 硫酸マグネシウム 0.5 g, くえん酸ナトリウム 1 g, ビオチン 100 μ g, カザミノ酸 500 mg とし, レプリカ用には寒天 23 g, 菌体調製用の高浸透圧合成培地にはシュクロース 68.5 g を添加した. プロトプラスト再生培地は, 関口ら⁶⁾の開発したポリビニルピロリドン再生培地を改変し用い, その組成は 1 l 当りグルコース 5 g, 硫酸 2 g, K_2HPO_4 3.5 g,

KH_2PO_4 1.5 g, 硫酸マグネシウム 2.5 g, くえん酸ナトリウム 1 g, ポリビニルピロリドン 30 g, 1.6 M こはく酸ナトリウム (pH 7.3) 125 ml, ビオチン 100 μ g, カザミノ酸 500 mg, 寒天 8 g とした. オートクレープは, 凝集を避けるため, グルコース, 硫酸マグネシウム, ポリビニルピロリドン, 寒天のグループと, 硫酸, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , こはく酸ナトリウム, くえん酸ナトリウム, カザミノ酸のグループに分けて行った. すなわち, 10/7 倍濃度の前者 7 ml, 10/3 濃度の後 3 ml を別々のねじ付試験管に分注し, 次いでオートクレープ滅菌し, 室温保存した. 使用時, 寒天を含む前者はあらかじめ 100°C で溶解後, 凝集を避けるため両者を恒温槽で 55°C に調整後, 混合した. 核酸塩基アデニンとウラシルは, 滅菌フィルターを通した 100 倍濃度のもの (核酸塩基 1 g/l) を別に用意し, 必要に応じ (すなわちプロトプラストの再生の確認の場合は添加, 復帰変異の有無や融合体の識別の場合は無添加) その 100 μ l をシャーレにとり, 10 ml の培地で混釈した. 総菌数計数ならびにプロトプラスト化確認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.

3. 変異株の作出と菌体の調製

核酸塩基要求変異株の作出は, 微生物遺伝学実験法⁷⁾に準じ, 以下のように行った. 最少培地で培養した菌体を, 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 6) 中, N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンで処理 (100 μ g/ml, 37°C, 20 分) し, 次いで混合核酸塩基 (ade, cyt, gua, hyp, thy, ura, xan) を添加した培地で増殖させた後, 最少培地に移した. 未変異親株が増殖し始めたころ, ペニシリン処理 (終濃度 500 U/ml) し, 生残った菌体集団を, 核酸塩基を添加した最少培地で培養し, 核酸塩基要求株群を濃縮した. このペニシリン処理による濃縮操作を3回繰返した後, マスタープレートをつくり, 核酸塩基添加および無添加の最少寒天培地にレプリカし, 核酸塩基添加で生育し無添加で生育しないコロニーをマスタープレートより釣り上げた. 次いで, レプリカ法により, どの核酸塩基を要求するか決定した. 各変異株は要求性を確認した後, 高浸透圧合成培地で 30°C, 16~24 時間培養し, 濃縮小分けして, 12.5% グリセリン中, -75°C に凍結保存した.

4. プロトプラスト化と再生

凍結保存菌体 (生菌数 $10^7 \sim 10^8$ 個) を高浸透圧緩衝液 (0.5 M シュクロース, 0.02 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.5), 0.02 M 硫酸マグネシウム) で遠心洗浄し, 沈殿菌体に, 1% 牛血清アルブミンを含む上述の高浸透

圧緩衝液とリゾチームを加え（総容量 2 ml, リゾチーム終濃度 250 $\mu\text{g/ml}$ ）、42°C で 45 分間処理し、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（「ニッスイ」一般細菌用普通寒天培地）で生育しないことから確認した。

再生は次のように行った。リゾチーム処理した菌液 0.1 ml を、1% 牛血清アルブミンを含む高浸透圧緩衝液 0.9 ml で、10 分の 1 ごとに段階的に希釈し、必要に応じてあらかじめ核酸塩基 100 μl を入れたシャーレに、段階希釈した菌液の 100 μl をとり、再生培地で混釈した。シャーレは、水分蒸発による培地の白濁を防ぐため、プラスチック容器（ラストロウエア）に入れ、30°C で約 4 日間保持した。要求核酸塩基を添加した再生培地に出現するコロニーを計数し再生数を求めた。

5. プロトプラストの融合

リゾチーム処理して得たアデニン要求株とウラシル要求株のプロトプラスト液各 1 ml を混合し、1% 牛血清アルブミンを含む高浸透圧緩衝液で遠心洗浄し、沈殿菌体を、0.1 ml の 1% 牛血清アルブミンを含む高浸透圧緩衝液に懸濁した後、40% ポリエチレングリコールを含む高浸透圧緩衝液 0.9 ml（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、42°C で 1 分保った後、氷中に戻し、ただちに 1% 牛血清アルブミンを含む高浸透圧緩衝液で段階希釈し、以下前項に示した再生操作を行った。

実験結果と考察

これまでの成果¹⁾⁻³⁾をもとに実用株納豆菌の細胞融合では、① 低濃度こはく酸ナトリウムを特徴とする再生培地で、② カザミノ酸に影響されない核酸塩基マーカを持つ変異株を作出し、③ 簡便な混釈法で行うことにした。上記 3 点を満たす再生培地として NP 再生培地を考案した。

表 1 に、NP 再生培地の開発の経緯とその特徴を示す。NP 再生培地は、原再生培地に再生刺激物質ポリビニルピロリドンを導入し開発された関口ら⁹⁾の HC*P 再生培地を基礎に作った。その特徴は、高張剤こはく酸ナトリウムの 0.5 M から 0.2 M への低下、すなわち水分活性 0.9912 から 0.9964 への増加、核酸塩基要求変異株採用のためカザミノ酸 500 mg/l の添加、また納豆菌に対応できるようにビオチン 100 $\mu\text{g/l}$ の添加、さらに融合体の識別が混釈法により 1 段階でできる点にある。

次に納豆菌より核酸塩基要求株を作出した。表 2 に取得した核酸塩基要求株の NP 再生培地における復帰変異試験を示す。MN-1 株は三浦菌より作出したアデニン要求株、TN-株は高橋 2 号菌より作出したウラシル要求株である。変異株作出直後の復帰変異率はかなり高く、復帰変異率の低い集団にするため数回のスクリーニングが必要であった。最終的に得られた三浦菌 MN-1 株（アデニン要求株）の復帰変異率は 10^{-6} のレベル、

表 1 納豆菌用 NP 再生培地の開発の経緯とその特徴

原再生培地 ^{a)}	改良再生培地 ^{b)}	P 再生培地 ¹⁾	NP 再生培地
アミノ酸要求株を利用 こはく酸ナトリウム 0.5 M	アミノ酸要求株を使用 こはく酸ナトリウム 0.5 M	アミノ酸要求株を使用 こはく酸ナトリウムを 0.2 M に減少	核酸塩基要求株を使用 こはく酸ナトリウム 0.2 M 添加
	水分活性値 0.9912	水分活性値 0.9964 に 上昇	水分活性値 0.9964
カザミノ酸を 5 g// 添加	カザミノ酸を 20 mg// 添加	カザミノ酸を 1 mg// に減少	カザミノ酸を 500 mg// に増加
馬血清を 5 ml// 添加	馬血清の代わりに再生 刺激物質ポリビニル ピロリドンの導入	ポリビニルピロリドン 添加	ポリビニルピロリドン 添加
		ビオチンの添加	ビオチン添加
融合体検出は 2 段階で行う	融合体検出は 1 段階で行う	融合体検出は 1 段階で行う	融合体検出は 1 段階で行う
塗抹法→ レプリカ法	重層法	混釈法	混釈法

^{a)} DPA 培地⁶⁾ ^{b)} HC*P 培地⁶⁾

高橋菌 TN-2 株（ウラシル要求株）の復帰変異率は 10^{-5} のレベルであった。スクリーニングを継続しても、これより低い復帰変異率にすることはできなかったが、融合率が復帰変異率 10^{-6} のレベルより高ければ融合は実証できると判断し、供試することにした。栄養培地におけるコロニーの形態は、変異前と変異後で変化は見られなかった。MN-1 株は栄養培地に出現するコロニー数より再生培地に出現するコロニー数の方が常に上回った。栄養培地にアデニンが欠けているためとも考えられ、MN-1 株（アデニン要求株）供試の際、アデニンを添加してみたが増加はみられなかった。したがってこの原因は、栄養培地にアデニンが欠けているためではない。断定はできないが、次のように考えられる。リゾチーム処理を容易にするため、供試菌株は高浸透圧合成培地で調製した。変異によりもし細胞壁に欠陥が生じていれば、菌体調製の際の高浸透圧下では破裂を免れても、低浸透圧下では破裂するといったことが考えられる。この理由により、低張の栄養培地に出現するコロニー数より高張の再生培地に出現するコロニー数の方が上回ったと推定される。両変異株は復帰変異率に変動を来さぬよう、実験 1 回分ごとに小分けし、グリセリン中、 -75°C に凍結保存した。

表 3 と表 4 に、作出した核酸塩基要求変異株のプロトプラスト化とその再生を示す。リゾチーム濃度、処理温度は、 $250\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 42°C に固定し、リゾチーム処理時間に対する低張の栄養培地と高張の再生培地に出現するコロニー数で示した。プロトプラストは高張の条件でのみ維持可能で、低張の条件では破裂する。したがって低張の栄養培地に出現するものはリゾチーム耐性菌で、高張の再生培地に出現するものがプロトプラスト再生菌で

ある。

MN-1 株（アデニン要求株）の場合（表 3）、プロトプラスト化後の再生培地におけるコロニー出現率は、リゾチーム未処理のコロニー出現数を基準とした場合、100% を越えた。100% を越えるのは、菌が鎖状に連なっているためで、リゾチーム処理でプロトプラスト化される際、同時に鎖も個々の細胞に分断されるためである。これは顕微鏡による観察結果からも確認された。真の再生率を求めるには、鎖状の菌をバラバラにしたとき生ずる細胞数を知る必要がある。しかしこのことは困難なため真の再生率は算出できない。したがって便宜的に表 3 には、リゾチーム処理時間 45 分の再生培地におけるコロニー出現数を基準とした暫定的再生率で示した。同様の値を基準として求めたリゾチーム耐性菌出現率はおよそ 0.03% であった。

TN-2 株（ウラシル要求株）の場合（表 4）も MN-1 株と同様に、リゾチーム未処理のコロニー出現数を基準とした場合、プロトプラスト化後の再生培地におけるコロニー出現率は 100% を越えた。同様に真の再生率を求めることは困難なため、便宜的にリゾチーム処理時間 45 分の再生培地におけるコロニー出現数を基準とした暫定的再生率で示した。同様の値を基準として求めたリゾチーム耐性菌出現率は、0.0005% で事実上無視しうる程度であった。

以上の試験から融合株の識別とプロトプラストの再生は同時に可能と判断された。

表 5 に、MN-1 株と TN-2 株間の融合結果を示す。融合の第 1 段階を実証すべく、緒論で述べた ① から ⑤ の 5 項目を並行試験で行った。① 溶菌酵素処理でコロニーが出現しなくなる（プロトプラストの形成）は

表 2 納豆菌核酸塩基要求株の NP 再生培地におけるコロニー出現と復帰変異頻度

変異株	培 地	コロニー出現数/0.1 ml							復帰変異 頻度
		10^0	10^{-1}	10^{-2}	希 釈 度 10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
MN-1	栄養培地 + ade	>	>	>	>	541	52	3	10^{-6}
	再生培地 + ade	>	>	>	>	699	126	23	
	再生培地 —	5	1	0	0	0	0	0	
TN-2	栄養培地 —	>	>	>	>	655	72	3	10^{-5}
	再生培地 + ura	>	>	>	>	668	80	9	
	再生培地 —	68	10	2	0	0	0	0	

MN-1：三浦菌より作出したアデニン要求株

TN-2：高橋納豆 2 号菌より作出したウラシル要求株

表 3 MN-1 株^{a)}のプロトプラスト化とその再生

リゾチーム 処理時間 (分)	培 地	コロニー出現数/0.1 ml						リゾチーム 耐性菌 出現率* (%)	暫定的 再生率* (%)
		希 釈 度							
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
15	栄養培地	109	133	17				0.04	
	再生培地+ade	>	>	>	>	208	22		68.2
30	栄養培地	126	89	10				0.03	
	再生培地+ade	>	>	>	>	289	27		94.8
45	栄養培地	130	96	21				0.03	
	再生培地+ade	>	>	>	>	305	27		100
未処理	栄養培地	>	>	>	863	72	8		
	再生培地+ade	>	>	>	>	142	13		

* 暫定的再生率は、リゾチーム処理時間 45 分、希釈度 10⁻⁴の再生培地に出現したコロニー数を基準に計算した。
(連鎖状の菌が切断されながらプロトプラスト化されるため、未処理の値を基準に計算すると、再生率が 100%
を越える。真の再生率を求めるには鎖状の菌をバラバラにしたとき生ずる細胞数を基準とすべきであるが、そ
れを調べることは困難なため。)

リゾチーム耐性菌出現率についても同様の値を基準とした。

リゾチーム濃度：250 μg/l 処理温度：42℃ 再生培地：NP 再生培地

^{a)} 三浦納豆菌より作出したアデニン要求株

表 4 TN-2 株^{a)}のプロトプラスト化とその再生

リゾチーム 処理時間 (分)	培 地	コロニー出現数/0.1 ml						リゾチーム 耐性菌 出現率* (%)	暫定的 再生率* (%)
		希 釈 度							
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
15	栄養培地	184	71	11				0.007	
	再生培地+ura	>	>	>	>	598	59		55.1
30	栄養培地	17	5	4				0.0005	
	再生培地+ura	>	>	>	>	1095	101		94.4
45	栄養培地	4	5	0				0.0005	
	再生培地+ura	>	>	>	>	1022	107		100
未処理	栄養培地	>	>	>	>	82	9		
	再生培地+ura	>	>	>	>	71	5		

* 暫定的再生率は、リゾチーム処理時間 45 分、希釈度 10⁻⁵の再生培地に出現したコロニー数を基準に計算した。
(連鎖状の菌が切断されながらプロトプラスト化されるため、未処理の値を基準に計算すると、再生率が 100%
を越える。真の再生率を求めるには鎖状の菌をバラバラにしたとき生ずる細胞数を基準とすべきであるが、そ
れを調べることは困難なため。)

リゾチーム耐性菌出現率についても同様の値を基準とした。

リゾチーム濃度：250 μg/l 処理温度：42℃ 再生培地：NP 再生培地

^{a)} 高橋納豆 2 号菌より作出したウラシル要求株

表中 7 (MN-1 株) と表中 10 (TN-2 株) に示される。
実際には MN-1 株に 1% 程度のリゾチーム耐性菌が計
数された。② 高張の再生培地で出現すること (プロト
プラストの再生) は表中 8 (MN-1 株) と表中 11 (TN-

2 株) に示される。③ マーカー成分の添加で出現し、
無添加で出現しないこと (復帰変異) は表中 8 と 9
(MN-1 株)、表中 11 と 12 (TN-2 株) に示される。実
際には TN-2 株は 10⁻⁵ レベルで復帰変異がみられた。

表 5 三浦菌と高橋納豆 2 号菌の細胞融合

コロニー出現数/0.1 ml							融合率
10 ⁰	10 ⁻¹	希 積 度 10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
リゾチーム処理前							
MN-1 (ade 要求株)							
1 投入菌数 (栄養培地)				>	283	19	
2 コロニー出現数 (再生培地+ade)				>	390	38	
3 復帰変異数 (再生培地 -)	0	0	0				
TN-2 (ura 要求株)							
4 投入菌数 (栄養培地)				233	22	2	
5 コロニー出現数 (再生培地+ura)				273	33	10	
6 復帰変異数 (再生培地 -)	4	0	0				
リゾチーム処理後							
MN-1							
7 リゾチーム耐性数 (栄養培地)	133	272	38				
8 コロニー出現数 (再生培地+ade)				>	350	33	
9 復帰変異数 (再生培地 -)	0	0	0				
TN-2							
10 リゾチーム耐性数 (栄養培地)	6	4	0				
11 コロニー出現数 (再生培地+ura)				>	656	77	
12 復帰変異数 (再生培地 -)	38	1	2				
混合 MN-1+TN-2							
13 融合の対照 (再生培地 -)	26	5	0	0	0	0	
融合処理後							
MN-1×TN-2							
14 MN-1 生菌数確認 (再生培地+ade)				>	326	37	
15 TN-1 生菌数確認 (再生培地+ura)				>	235	35	
16 融合数 (再生培地 -)	468	49	14	0	0	0	
						0.02 ^{a)}	

MN-1: 三浦菌より作出したアデニン要求株

TN-2: 高橋納豆 2 号菌より作出したウラシル要求株

再生培地: NP 再生培地

^{a)} 融合処理後, アデニンあるいはウラシルの添加で出現した少ない方の数に対する%

④ マーカー成分無添加で, 単に混合したのみでは出現しないこと (融合の対照) は表中 13 に示される. TN-2 株が 10⁻⁵ レベルで復帰変異するため, 実際には同レベルのコロニーが出現した. そして⑤ マーカー成分無添加で, 融合処理後出現すること (融合株の検出) は表中 16 に示される. 融合の対照試験と比べ, 10~18 倍高い値を示しており, 融合が起きていると判断される. 以上実用株納豆菌で融合の第 1 段階が確認された. 復帰変異分を差し引いた融合率は, 融合処理後のプロトプラス

ト再生数に対しおよそ 0.02% であった.

要 約

実用株納豆菌で細胞融合を行った. 問題点は融合株の識別にある. ① バクテリアは低水分活性に弱いこと, ② アミノ酸マーカーを用いた場合, カザミノ酸が制限されるため, プロトプラスト再生に限界があること, ③ 混釈法で簡便かつ確実に行えることなど, 前報の知見をもとに以下のごとく行った.

(1) 関口らの再生刺激物質ポリビニルピロリドン再生培地を基本に、高張剤としては酸ナトリウムの 0.5 M から 0.2 M への低下、カザミノ酸 500 mg/l 添加、ビオチン添加を特徴とする納豆菌核酸塩基要求株用の新再生培地 (NP) を採用した。

(2) 三浦菌と高橋 2 号菌よりアデニン要求株、ウラシル要求株を作出し、新再生培地でマーカーが発現されることを確認した。復帰変異率は、MN-1 株 (アデニン要求株) 10^{-6} レベル、TN-2 株 (ウラシル要求株) 10^{-5} レベルであった。

(3) NP 再生培地におけるプロトプラスト化後のコロニー出現率は、リゾチーム未処理で出現する数を基準とすると 100% をはるかに越えた。100% を越えるのは、リゾチーム処理で鎖状菌が分断された後再生するためと考えられる。

(4) NP 再生培地と納豆菌核酸塩基要求株を用い、プロトプラストの形成、その再生、復帰変異試験、融合の対照試験、融合株の検出の 5 項目の並行試験により、実用株納豆菌で融合が起きていることを確認した。復帰変

異分を差し引いた融合率は、融合処理後のプロトプラスト再生数に対しおよそ 0.02% であった。

文 献

- 1) 岡田憲幸・秋本隆司・真鍋 勝：日食工誌, **36**, 732 (1989).
- 2) 岡田憲幸・秋本隆司・真鍋 勝：食総研報, **54**, 29, (1990).
- 3) 岡田憲幸・秋本隆司・新国佐幸・真鍋 勝：日食工誌, **37**, 270 (1990).
- 4) 長谷川喜衛・狗田 徹・小幡 斉・徳山 泰：日食工誌, **35**, 154 (1988).
- 5) 木内 幹・田谷直後・ジョコ スリシチョ・舟根和美：食総研報, **50**, 18 (1987).
- 6) 関口順一：細菌の細胞融合技術、遺伝子組換え実用化技術, 第 3 集, 元山裕孝編 (サイエンスフォーラム), p. 133 (1982).
- 7) 西村行進・広田幸啓：大腸菌, 微生物遺伝学実験法, 石川辰夫編 (共立出版) p. 81 (1984).

(平成元年 12 月 6 日受理)