

## 細菌スフェロプラストの調製と応用

馳 澤 盛一郎\*

細菌のスフェロプラスト(細胞壁を除去した細胞)を外來遺伝情報の運び手として形質転換に用いる手法は、ユニークな方法として動・植物の細胞を対象に行われている。しかし、スフェロプラストの調製には若干の技術を要するため、必ずしも一般的な手法にはなっていないのが現状である。とりわけ、グラム陰性細菌を材料とする場合には、細胞壁のペプチドグルカン層の外にタンパク質・脂質・リボ多糖類から成る外側の膜があり、リゾチームの作用が妨害される。それを解消するため EDTA などが併用されることが多い。また、スフェロプラストの調製を容易にするために、強固な細胞壁を作らせない方法として、事前にペニシリンなどペプチドグルカンの合成を阻害する薬剤を培養液に混入する方法も用いられている。ところで、多くの場合、この外側の膜の残渣が、得られた細胞質の球体に付随していることが多く、ゆえにプロトプラストではなくスフェロプラストと呼ばれることが多い。

本稿では、アグロバクテリウムと大腸菌のケースを例として取り上げ、以下にスフェロプラストの簡便な調製法について解説して行きたい。

1) アグロバクテリウム・スフェロプラストの調製<sup>1-3)</sup>

〔準備〕 i) 細菌: 3週ごとに NB 寒天培地 (0.8% Nutrient Broth, 1.5% Bacto-agar) 上で継代されているアグロバクテリウム(例: *Agrobacterium tumefaciens* A 277) を AB 培地(第1表)に懸濁し、30℃で一晩、浸漬培養した対数期後期の細菌を用いる。 ii) 実験器材: 冷却遠心機・恒温槽・倒立顕微鏡・バクテリア計算盤・ナイロンメッシュ・ロート・ポリカーボネート遠心管・ピペットなど。〔方法〕材料とする細菌の培養液に 500 mg/l カルベニシリンを加え、振盪培養を続行する。2時間後、アグロバクテリウムを遠心 (10,000 rpm, 10 min, 室温) で集菌し、Tris-buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM 2 Na-EDTA, 0.4 M Sorbitol, pH 8.2) で洗浄後、細菌数をカウントして必要量を 400 mg/l リゾチー

ム溶液(上記 Tris-buffer にリゾチームを加えた溶液)中に約  $5 \times 10^8$ /ml の濃度に懸濁し、30℃で放置する(15~30分ごとに手で軽く振盪するとよい)。2時間後、遠心 (5,000 rpm, 10 min, 室温) でスフェロプラスト(写真1)を集め、0.4 M ソルビトール(マンニトールでも良い)溶液で洗滌後、再度の遠心で得たペレットを目的に応じて適当な濃度に懸濁し、実験に用いる。

2) 大腸菌スフェロプラストの調製<sup>4,5)</sup>

〔準備〕 i) 細菌: 3週ごとに LB 寒天培地 (1% Bacto-Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.5% NaCl, 1.5% Bacto-agar, pH 7.2) 上で継代されている大腸菌(例: *Escherichia coli* C 600) を Fraser & Jerrel の培地(第2表)(LB 液体培地でも良い)中に懸濁し、37℃で約12時間、振盪培養した細菌を用いる。 ii) 実験器材: 前項に準ずる。〔方法〕遠心 (10,000 rpm, 10 min, 室温) で集菌、0.01 M Tris-buffer (pH 8.0) で洗滌し、必要量を分取して再び遠心で集菌後に 0.5 M sucrose を添加した上記 Tris-buffer に懸濁する。30分以上放置してから 20 mg/l リゾチームを加えて良く混合し、10分間、室温に放置する。さらに、最初の Tris-buffer を 1:1 に加えてよく混合した後、1 mM 2 Na-EDTA を加え、15分間、室温に放置する。遠心 (5,000 rpm, 10 min, 室温) でスフェロプラスト(写真2)を集め、マンニトール溶液などで洗滌してから、実験に用いる。

## 3) 技術上の注意事項

i) 遠心で intact な細菌を集めるときには 10,000 rpm 以上でもよいが、リゾチーム処理後では、5,000 rpm 以下で行う(いずれの場合も室温で行った方がよい)。

ii) リゾチーム処理後の洗滌の際にはピペッティングは慎重に行い、完全にほぐれるまでゆっくりと根気よく続ける(乱暴に行くとスフェロプラストがバーストする)。

iii) 材料とする細菌は、対数期後期(濃度: 約  $5 \times 10^9$  /ml) にまで増殖したものを用いる。

iv) スフェロプラストの調製に用いる試薬溶液は、10×などのストック液を準備し、無菌化した後、1回分づ

\* Seiichiro Hasezawa: Preparation of Bacteria Spheroplasts and Their Application  
成城短期大学 (〒157 東京都世田谷区成城 6-1-20)

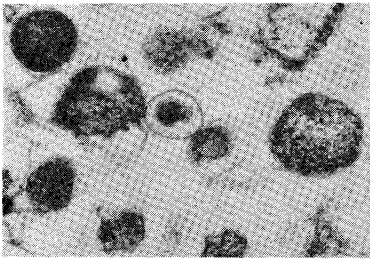


写真1

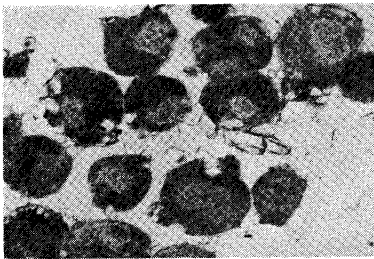


写真2

リゾチーム処理により生じた細菌の  
スフェロプラスト

写真1はアグロバクテリウム (×8,400),  
写真2は大腸菌のもの (×7,800) (名古屋  
大学 松井千秋氏の撮影による)

第1表

AB medium	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 g
KCl	0.15 g
CaCl <sub>2</sub>	0.01 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.5 mg
glucose	5 g/l

第2表

Fraser & Jerrel's medium	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.6 g
Casamino acid	15.0 g
glycerol	30.0 g
1 M CaCl <sub>2</sub> solution	0.3 ml/l

つ小分けしておくくと便利である (たとえば大腸菌の例では、菌の必要量を分取した後、9.5 ml の Tris-buffer-sucrose 液に懸濁すれば、以下のステップは、0.5 ml の 20×リゾチーム液、10 ml の Tris-buffer 液、2.2 ml の

10×2 Na-EDTA 液を次々に加えて混合して行くことになり、この全操作は1本の遠心管中で行える。)

v) アグロバクテリウムのリゾチーム処理の際には、ときどき様子を見ながら手で浸盪してやるのがよいが、スフェロプラスト化の効率が悪いときには常時、弱い浸盪 (60 rpm 程度) を加えるのも1つの方法である (ただし、その場合にはアグリゲートの起こる危険性は高くなる。)

4) スフェロプラスト化の確認

細菌のスフェロプラスト化を確認する方法はいくつかあるが、最も簡便なものは、スフェロプラストの濃い懸濁液を蒸留水に滴下する方法である。十分にスフェロプラスト化している場合には、低張液中で細胞がバーストした様子が肉眼で確認できる。また、高倍率の光学顕微鏡 (油浸顕微鏡など) を用いれば、元の桿菌とスフェロプラストを識別することは容易である。さらに、細部にわたってスフェロプラスト化の状況を観察する必要性のある場合には、電子顕微鏡を用いるのが確実であろう。しかし、通常の場合には上の2法で十分であるし、また慣れてくると、肉眼で見たベレットの状態やピペッティングの際のほぐれ方などから、ある程度の見当はつくものである。

5) スフェロプラスト使用上の問題点

スフェロプラストの植物プロトプラストへの取り込みや細菌スフェロプラスト間の融合には、植物プロトプラスト間の融合に類似した条件が用いられる。したがって、ポリエチレングリコール (PEG) が用いられるが、大腸菌のように比較的大きなスフェロプラストの導入には、植物プロトプラストのシュリンクを引き起こさないポリビニルアルコール (PVA) の方がよいと思われる。また、最近ポピュラーになりつつある、電気パルスによる方法もこのような目的に応用できるのではないかとと思われる。

さて、スフェロプラストが利用しにくい点の1つにスフェロプラストによる処理後の除菌の難しさがある。スフェロプラスト化した細菌も元の菌体への復元能力があるため、これらと植物プロトプラストの融合処理を行ったような場合には、洗滌後に必ず除菌対策が必要とされる。アグロバクテリウムのように熱に弱いものは高温 (約 40℃) による除菌も可能であるが、一般的に除菌には抗生物質が用いられる。ペニシリン系、テトラサイクリン系などの薬品を細菌の種類によって使い分ければよいわけだが、アグロバクテリウムなどにはヴァンコマイシン (例: 200 mg/l)、セファタキシム (500 mg/l)、カルペニシリン (200 mg/l) など、大腸菌には上記の他に

ホスミシン (50~200 mg/l) などが経験上、有効である。これらの抗生物質は当然のことながら高濃度で用いる方が除菌は確実に行えるが、その濃度の上限は常に相手の植物プロトプラストの耐えられる限度との兼ね合いになることはいうまでもない。

(1986年11月6日受理)

## 文 献

- 1) A. M. Ledebøer, A. J. M. Krol, J. J. M. Dons, F. Spier, R. A. Schilperoort, I. Zaenen, N. van Larebeke, J. Schell, 1976. Nucl. Acid Res., **3**: 25.
- 2) S. Hasezawa, T. Nagata, K. Syōno, 1981. Mol. Gen. Genet., **182**: 206.

- 3) R. Hain, H.-H. Steinbiß, J. Schell, 1984. Plant Cell Rep., **3**: 60.
- 4) D. C. Birdsell, E. H. Costa-Robles, 1967. J. Bacteriol., **93**: 427.
- 5) C. Matsui, S. Hasezawa, N. Tanaka, K. Syōno, 1983. Plant Cell Rep., **2**: 30.

その他、総説関係では

- K. Syōno, S. Hasezawa, 1985. In "Biotechnology," Technomic Pub., Lancaster-Basel, p. 463.
- D. A. Hopwood, 1981. Ann. Rev. Microbiol., **35**: 237.
- J. F. Peberdy, 1980. Enzyme Microb. Technol., **2**: 23.
- 庄野邦彦, 馳澤盛一郎, 1984. 組織培養, **10** (14): 570 など