

納豆菌の一般形質導入ファージ *Bacillus subtilis* (*natto*) phage BN100
A generalized transducing phage, BN100, of *Bacillus subtilis* (*natto*)

独立行政法人農業生物資源研究所・ジーンバンク

永井利郎

独立行政法人食品総合研究所・発酵細菌研究室

伊藤義文

微生物名 *Bacillus subtilis* (*natto*) phage

MAFF 登録番号 MAFF 270100

納豆菌 *Bacillus subtilis* (*natto*) で、納豆の発酵不良の原因となるファージの研究がなされているが、形質導入能を持つファージは知られていなかった。そこで、納豆菌に対して形質導入能を有するファージを検索したところ、発酵不良納豆から分離されたファージ(BN100, 登録番号 MAFF 270100)に、形質導入能があることを見いだした(2)。BN100は多角形の頭部(60 nm × 67 nm)と非収縮性の尾部(200 nm × 7 nm)を有している(図1)。ゲノムの大きさは約 42 kb である。プラークの形成(図2)には、マグネシウムイオンが必要である。マグネシウムイオン非存在下においては、プラーク形成は全く見られない。BN100は市販の納豆種菌である成瀬菌及び高橋菌に感染し、プラークを形成するが、三浦菌(市販納豆種菌)やゲノムの全塩基配列が決定された Marburg 株には感染しない。

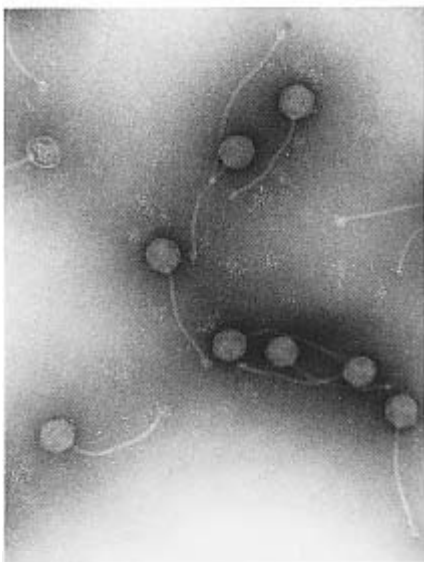


図1 BN100の電子顕微鏡写真
太線は 100 nm を表す

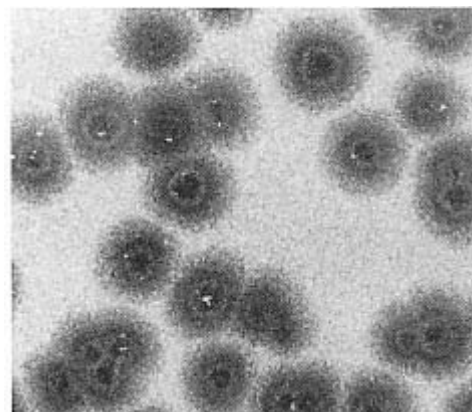


図2 BN100のプラーク形成

増殖方法

重層寒天培地を用いた例を示す。宿主(例えば, *B. subtilis* MAFF118080)を 37℃ で一晩振とう培養して得られた培養液 100 μl に、50 μl のファージ液(約 5×10^7 PFU, SM に懸濁されている)を加え、37℃ で 20 分間保温する。更に、300 μl の 0.5 M MgSO₄ を加え、3 ml の軟寒天(LB 培地, 0.5% 寒天)を混合し、それを LB 寒天培地(10 mM MgSO₄ を含む)に重層する。培養は 37℃ で行う。寒天上に 4ml の SM と、数滴のクロロフォルムを添加し、冷蔵庫に一晩静置した後、寒天上の SM をパスツールピペットで回収する。得られた SM に含まれる宿主菌を遠心分離で除いた後、0.2 μm の滅菌フィルターでろ過し、ファージ懸濁液とする。

LB 培地: 1% ペプトン(Difco), 0.5% 酵母エキス(Difco), 1% NaCl (1)。

SM: 0.1 mM NaCl, 50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 0.2% MgSO₄·7H₂O, 0.01% ゼラチン (1)。

形質導入

受容菌を LB 培地を用いて、37℃ で一夜培養する。この受容菌の培養液 400 μl を、12 ml LB 培地に接種し、L 字管で定常期直前(5 時間)まで、37℃ で振とう培養する。細胞を遠心分離で集め、ファージ懸濁液と SM を加える(合計 500 μl, ファージ終濃度 4×10^8 PFU/ml, 感染多重度 約 1)。37℃ で 20 分間保温した後、遠心分離により集菌し、菌体を 0.85% NaCl(300 μl)に懸濁する。菌体懸濁液を適宜希釈し、適量を選択培地に塗布する。

保存法

懸濁液の状態でも、冷蔵庫で数カ月保存可能である。真空凍結乾燥する場合には、保護剤として 1% グルタミン酸ナトリウム + 10% スキムミルクを用いる。

応用例

B. subtilis (*natto*) の栄養要求株(アデニン要求株など)へ、栄養要求性を相補する遺伝子の形質導入を行ったところ、 10^{-8} から 10^{-6} の頻度で形質導入株が得られた。*B. subtilis* (*natto*) の染色体上に人為的に組み込まれた薬剤耐性遺伝子マーカーも同頻度で形質導入された(2)。

低臭納豆菌の育種の過程で、組み替え操作されたロイシン脱水素酵素遺伝子の形質導入に、本ファージが用いられた(3)。

参考文献

1. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
2. Nagai, T. and Itoh, I. (1997) Characterization of a generalized transducing phage of poly-

-glutamic acid-producing *Bacillus subtilis* and its application for analysis of Tn917-LTV1 insertional mutants defective in poly- -glutamic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4087-4089

3. 竹村浩・安藤記子・塚本義則 (2000) 短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌の育種と低臭納豆への利用．日本食品科学工学会誌, **47**, 773 -779

(発行)独立行政法人農業生物資源研究所

生物研資料 13-(13)

平成 14 年 3 月

March, 2002