

〔醸酵工学 第61巻 第1号 15-18. 1983〕

ノ ー ト

Gluconobacter 属細菌のプラスミド

舩田 誠・川崎 東彦・外村 健三

大阪府立大学農学部農芸化学科

Plasmids in *Gluconobacter*. MAKOTO MASUDA, HARUHIKO KAWASAKI, and KENZO TONOMURA (Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591, Japan) Hakkokogaku 61: 15-18. 1983.

Thirty-seven strains of a type culture of *Gluconobacter* were examined for the presence of plasmids; plasmids were extracted by the methods of Kado and Liu, Birnboim and Doly, Hansen and Olsen, and Clewell and Helinski, and subjected to electrophoresis on agarose gel followed by measurement of their molecular weight. Of the four methods of extraction, the method of Kado and Liu seemed to be most suitable. Plasmids of one to four species were found in twenty-seven strains among the strains tested. Molecular weights were in the range of 2 to 72 M dalton. The functions of these plasmids are not presently known.

Gluconobacter 属細菌 (G 菌) と *Zymomonas* 属細菌 (Z 菌) は、系統発生的に共通の祖先から分かれてきたのではないかと推定されている。¹⁾ すなわち、両菌とも極鞭毛を有し、Entner-Doudoroff 経路によりグルコースを容易に代謝し、TCA サイクルは不完全で、高いエタノール耐性とグルコース耐性を持ち、Z 菌は嫌氣的にエタノールを生成し、G 菌は好氣的にそのエタノールを酸化する。いずれも植物の汁液のあるところに生育し、酸性の環境を好む。ゲノムサイズは Z 菌が 1.5×10^9 dalton、多くの G 菌が 1.6×10^9 dalton である。ただし、GC 含量は Z 菌が約 48%、G 菌は 60~64% と異なる。これらの共通点をもとにしてこの説は、両菌は共通の好気性菌を祖先とし、Z 菌は嫌気性の方向に、G 菌は好気性の方向に、いずれも TCA サイクルと電子伝達系の酵素のいくつかを失なって、進化してきたのではないかと考えている。

著者らは前に、Z 菌にプラスミドが存在することを初めて報告した。²⁾ ここでは、G 菌の有用なプラスミドを Z 菌の育種に利用することを目標として、G 菌のタイプカルチャー 37 株についてプラスミドを検索した結果について報告する。

G 菌は、2% glycerol, 1% yeast extract, および 0.5

% Polypepton, pH 6.5 よりなる培地に 30°C、好氣的に振とう培養した。プラスミドの抽出は、次の 4 つの方法について行った。(i) Kado, Liu のアルカリ・SDS 法,³⁾ (ii) Birnboim, Doly のアルカリ抽出法,⁴⁾ (iii) Hansen, Olsen 法,⁵⁾ および (iv) Clewell, Helinski の cleared lysate 法。⁶⁾ このうち、多くの場合にもっとも良好な結果を与えた (i) の方法について詳しく、他の方法についてはその概要を述べる。

Kado, Liu のアルカリ・SDS 法³⁾ 上述の培地に 24 時間培養した培養液 3 ml より菌体を集め、これをプラスミドを抽出する 1 回分の菌体量とした。これを 1 ml の E-buffer (40 mM Tris および 2 mM EDTA よりなる液を酢酸により pH 7.9 に調整したもの) に懸濁し、これに 2 ml の溶菌液 (50 mM Tris, 3% sodium dodecyl sulfate (SDS), および 0.15 N NaOH からなる液) を加え、65°C で 60 分間加熱した。この処理は、chromosomal DNA と RNA をプラスミド DNA から分離するのに有効に作用した。次にタンパク質と細胞の破片を除去するため、この液に phenol-chloroform (1:1) を 6 ml 加えて振とうし、上層の水溶液を分離して、粗プラスミドとした。

Birnboim, Doly のアルカリ抽出法⁴⁾ 上述の培

養液 0.5 ml 中の菌体量を、プラスミドを抽出する 1 回分の菌体量とした。菌体を lysozyme 処理および 1% SDS を含む 0.2N NaOH 添加により溶菌し、ついで 3M Na acetate (pH 4.8) を加え、chromosomal DNA, タンパク質・SDS 複合体、高分子の RNA を不溶化した。これを遠心除去し、上澄液にエタノールを加えてプラスミドを沈でんさせ、これを粗プラスミドとした。

Hansen, Olsen 法⁵⁾ 610 nm における OD 80 を示す菌体懸濁液 1 ml を、プラスミドを抽出する 1 回分の菌体量とした。Lysozyme と SDS を加えて溶菌し、NaOH で chromosomal DNA を変性させた後、中和し、次に SDS と NaCl を加えて細胞膜・染色体の複合体を塩析した。これを遠心分離により除去し、上澄液に polyethylene glycol 6000 を加えてプラスミドを濃縮、これを粗プラスミドとした。

Clewell, Helinski の cleared lysate 法⁶⁾ Hansen, Olsen 法と同量の菌体量をプラスミド抽出の 1 回分の菌体量として用いた。菌体に lysozyme, EDTA と detergent mixture (1% Brij 58, 0.4% sodium deoxycholate, 0.0625 M EDTA を含む 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0) を加えて溶菌後、透明な粘稠液を遠心分離した。上澄液(cleared lysate)をフェノール処理し、上層の水溶液中のフェノールをエーテルで抽出除去後、エタノールを加えてプラスミドを沈でんさせ、これを粗プラスミドとした。

Meyers⁷⁾ らの方法に従って、粗プラスミドをアガロースゲル電気泳動にかけ、プラスミドを観察した。用いたアガロースは同仁化学研究所製 agarose I (ゼリー強度 800 g/cm³ 以上)、ゲル濃度は 0.8%, 垂直スラブゲル (14×12×0.2 cm) を用い、E-buffer 中で、100 V, 30-35 mA で約 3 時間泳動した。泳動状態を知るため、粗プラスミド溶液に BJ solution (30% sucrose, 50 mM EDTA, および 0.05% bromophenol blue) または tracking dye solution (33% glycerol, 7% SDS, および 0.07% bromophenol blue) を泳動前に加えた。泳動後、ゲルを 1 μg/ml ethidium bromide 溶液で約 30 分間染色し、ゲルに UV を照射して DNA バンドを観察した。撮影には Polaroid Land Film Type 107 および Kodak Technical Pan Film 2415 を用いた。プラスミドの分子量は、試料プラスミドと分子量既知のプラスミドを同一ゲルで泳動し、その泳動距離より測定した。用いた分子量既知のプラスミドは、pVA 517 A~H (36, 4.8, 3.7, 3.4, 2.6, 2.0, 1.8 および 1.4 Mdal),⁸⁾ pMG1 (20 Mdal),⁹⁾ pTN2 (74 Mdal),⁹⁾ およ

び F (63 Mdal)¹⁰⁾ である。

G. suboxydans IFO 3289 のプラスミドを上記 4 つの方法で調製し、これをアガロースゲル電気泳動にかけて観察し、プラスミドの抽出方法を比較した一例を Fig. 1 に示す。17 Mdal 付近に認められる DNA は変性した chromosomal DNA と考えられ、Clewell 法でもっとも多く認められた。Hansen 法、Clewell 法および Birnboim 法で 6-8 Mdal 付近に 3 本のバンドが認められたが、これらのバンドは、プラスミド標品の保存期間が長くなったり、凍結融解を 2-3 回繰り返すことにより濃くなり、これにともなって下部に認められる 4, 3.7 および 3 Mdal の 3 本のプラスミドバンドが淡くなることより、下部 3 本のバンドを cc DNA, 上部 3 本のバンドを oc DNA と推定した。Kado らの方法では、下部 3 本のバンドのみが認められ、上部 3 本のバンドは認められなかった。

一般に、Kado らの方法によると、chromosomal DNA の変性バンドがほとんど認められず、このためプラスミドの泳動に及ぼす障害が小さくなり、分子量がより正確に測定できる点や、chromosomal DNA 付

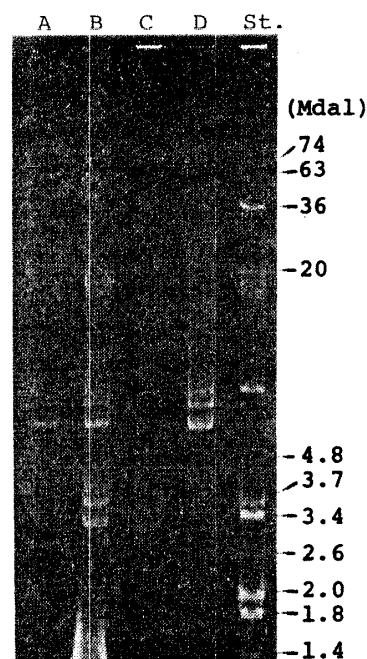


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of plasmids from *G. suboxydans* IFO 3289. Plasmids were prepared by the method of Hansen and Olsen⁵⁾ (A), Clewell and Helinski⁶⁾ (B), Kado and Liu⁹⁾ (C), and Birnboim and Doly⁴⁾ (D). Standard plasmids (St.): pTN2, F, pMG1, and pVA517 A~H. Electrophoresis was carried out in Tris-acetate buffer at 12 V/cm for 3 h using 0.8% agarose gel.

Table 1. Detection of plasmids in *Gluconobacter*.

Strain	Method				Number of plasmid bands detected	Molecular weight of plasmid detected (Mdal)
	A	B	C	D		
<i>G. liquefaciens</i> IFO 12388	—	—	—	—	no	
<i>G. melanogenus</i> IFO 12257	—	—	—	—	no	
<i>G. melanogenus</i> IFO 12258	—	—	—	—	no	
<i>G. melanogenus</i> IFO 3293	+	+	⊕	—	2	6, 63
<i>G. melanogenus</i> IFO 3294	—	—	—	—	no	
<i>G. sphaericus</i> IFO 12467	—	—	—	—	no	
<i>G. oxydans</i> IFO 3189	—	⊕	+	—	2	2, 3
<i>G. oxydans</i> IFO 3287	+	+	⊕	—	3	2, 9, 11
<i>G. dioxyacetonicus</i> IFO 3272	+		⊕	—	2	7, 40
<i>G. dioxyacetonicus</i> IFO 3273	—	—	—	—	no	
<i>G. dioxyacetonicus</i> IFO 3274	+	+	⊕	—	2	3, 22
<i>G. cerinus</i> IFO 3262	—		⊕	—	1	22
<i>G. cerinus</i> IFO 3263	+	+	⊕	—	4	3, 8, 41, 72
<i>G. cerinus</i> IFO 3264	+		⊕	—	1	25
<i>G. cerinus</i> IFO 3265	+		⊕	—	1	27
<i>G. cerinus</i> IFO 3266	⊕	—	+	+	2	6, 11
<i>G. cerinus</i> IFO 3267	+		⊕	—	2	12, 70
<i>G. cerinus</i> IFO 3268	—	—	—	—	no	
<i>G. cerinus</i> IFO 3269	⊕	—	—	+	2	4, 6
<i>G. cerinus</i> IFO 3270	—	—	—	—	no	
<i>G. gluconicus</i> IFO 3171	+		⊕	—	1	26
<i>G. gluconicus</i> IFO 3285	—	—	⊕	—	2	24, 58
<i>G. gluconicus</i> IFO 3286	+		⊕	—	2	24, 58
<i>G. albidus</i> IFO 3251	+		⊕	+	1	24
<i>G. albidus</i> IFO 3253	+		⊕	—	1	24
<i>G. suboxydans</i> IFO 3172	+	+	⊕	+	2	3, 4
<i>G. suboxydans</i> IFO 3289	+	+	⊕	+	3	3, 3.7, 4.0
<i>G. suboxydans</i> IFO 3290	—		⊕	—	1	24
<i>G. suboxydans</i> IFO 3291	+		⊕	+	3	3, 3.7, 4.0
<i>G. suboxydans</i> IFO 12528	—		⊕	—	3	2, 16, 46
<i>G. suboxydans</i> var. <i>a</i> IFO 3254	+		⊕	+	1	50
<i>G. suboxydans</i> var. <i>a</i> IFO 3256	+		⊕	—	1	50
<i>G. suboxydans</i> var. <i>a</i> IFO 3258	—		⊕	+	1	50
<i>G. capsulatus</i> IFO 3462	—	—	—	—	no	
<i>G. industrius</i> IFO 3260	⊕		+	+	3	7, 12, 22
<i>G. nonoxygluconicus</i> IFO 3275	⊕		+	—	1	12
<i>G. rubiginosus</i> IFO 3244	—	—	—	—	no	

Preparative methods for plasmids. A: Hansen and Olsen;³⁾ B: Clewell and Helinski;⁴⁾ C: Kado and Liu;⁵⁾ D: Birnboim and Doly.⁴⁾ The plus signs show that plasmids were detected by the indicated method, and the minus signs that plasmids were not detected. The sign ⊕ shows the preparation of a plasmid used for measuring its molecular weight.

近に位置するプラスミドを容易に確認できる点で、G 菌のプラスミドを抽出する方法としてはこの方法がもっとも適当な方法と考えられた。しかし、この方法は抽出操作中にプラスミド DNA の消失量が多く、プラスミドバンドが淡くなる傾向が認められた。この点は、プラスミドを濃縮することで補うことができた。

Hansen らの方法は、変性 chromosomal DNA が多く残る欠点のほかに、使用する菌体量が多く、抽出操作も煩雑であった。Clewell らの方法では、一般に溶菌が起こりにくく、detergent mixture を加えてからの処理時間を長くしても G 菌の溶菌はなお不完全であった。Birnboim らの方法では、多くの菌株でプラスミ

ドの検出はできなかった。

アガロースゲル上で cc DNA バンドと oc DNA または直鎖 DNA バンドを区別する方法として、前述の凍結融解を繰り返す方法以外に、次の方法も検討した。すなわち、プラスミド標品を 50 μ l マイクロシリンジを用いて吸入と排出を約20回繰り返し、物理的な力によって cc DNA を oc DNA または直鎖 DNA に変性させ、処理前後のプラスミドバンドの位置の変化、およびバンドの濃淡の変化を観察して、cc DNA を oc DNA や直鎖 DNA と区別した。この方法は約 20 Mdal 以上のプラスミドには有効であった。

Table 1 に、G 菌のタイプカルチャー37株についてプラスミドを観察した結果を示す。観察されたプラスミドの大きさは 2~72 Mdal、菌株により 1~数種のプラスミドの存在が認められた。プラスミドが認められた菌株は37株中27株であったが、既存の方法によりプラスミドが認められなかった菌株でも、プラスミドの抽出方法を改良することによりプラスミドの認められる可能性は残されている。

これらプラスミドの表現形質について、薬剤耐性、水銀耐性、炭素源の資化性と生酸性などを検討したが、それらの表現形質との関係については、これまでに明らかになっていない。

本研究に使用した *Gluconobacter* 属細菌はすべて山口大学農学部鮎山 実教授より分譲を受けました。ここに厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Swings, J., Ley, J. D.: *Bacteriol. Rev.*, **41**, 1 (1977).
- 2) Tonomura, K., Kurose, N., Konishi, S., Kawasaki, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2851 (1982).
- 3) Kado, C. I., Liu, S. T.: *J. Bacteriol.*, **145**, 1365 (1981).
- 4) Birnboim, H. C., Doly, J.: *Nucleic Acids Research* **7**, 1513 (1979).
- 5) Hansen, J. B., Olsen, R. H.: *J. Bacteriol.*, **135**, 227 (1978).
- 6) Clewell, D. B., Helinski, D. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*: **62**, 1159 (1969).
- 7) Meyers, J. A., Sanchez, D., Elwell, L. P., Falkow, S.: *J. Bacteriol.*, **127**, 1529 (1976).
- 8) Macrina, F. L., Kopecko, D. J., Jones, K. R., Ayers, D. J., McCowen, S. M.: *Plasmid*, **1**, 417 (1978).
- 9) Nakazawa, T., Hayashi, E., Yokota, T., Ebina, Y., Nakazawa, A.: *J. Bacteriol.*, **134**, 270 (1978).
- 10) Jacob, A. E.: DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes, (Bukhari, A. I., Shapiro, J. A., Adhya, S. L.), p. 613, Cold Spring Harbor Laboratory (1977).

(昭57. 8. 19受付)