

アミラーゼ生産菌からの高純度糸状デオキシリボ核 酸の調製

佐々木, 毅
九州大学農学部

箴島, 豊
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/22916>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 21 (1), pp.55-61, 1964-01. Faculty of Agriculture, Kyushu University

バージョン：

権利関係：



アミラーゼ生産菌からの高純度糸状 デオキシリボ核酸の調製

佐々木 毅・箴 豊

On the preparation of a highly purified and fibrous deoxy-
ribonucleic acid from amylase-producing bacteria,
Bacillus subtilis var. *amyloliquefaciens* Fukumoto K-49

Takeshi Sasaki and Yutaka Osajima

アミラーゼ生産菌, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto K-49 は工業的アミラーゼ生産に広く利用されている。タンク培養において大量生産が可能になったが、それに平行して各工場でバクテリオファージによる被害が観察されるようになった。ファージの増殖において最も重要な役割を果たすものは、デオキシリボ核酸 (DNA) であり、この物質の性質を解明することはタンク培養におけるファージ対策にとって欠くことができない課題でもあるので、我々の研究室ではアミラーゼ生産菌のバクテリオファージの生化学的研究を続けてきた。¹⁾

DNA は細胞分裂や遺伝現象に深い関係をもつているので、生体内および生体外でのこの物質の合成機構に関する研究が、今日ますます盛んになってきた。微生物あるいは動物組織の DNA 合成には、重合化の "primer" となる DNA の存在が必要であり、この primer は重合度の高い DNA でなくてはならない。また DNA の物理化学的性質を明かにする上にも、primer 同様、重合度の高い DNA が必要である。

今日一般に、得られた標品が糸状であるということはその重合度が高いということであり、とくに生化学的活性をもつた DNA の調製に際し重要な意味をもつと考えられる。

当研究室では、*B. subtilis* の DNA 調製についてこれまでアセトン乾燥菌体を材料として種々の方法を試みてきたが、²⁾ 細菌は動物細胞と異なり多糖類からなる細胞壁をもつているために、細胞を壊わさずに核酸の抽出を行なうことは不可能に近い。細胞壁破壊法には、機械的に磨砕する方法、界面活性剤を用いる方法等が知られ、これらについて比較検討したが何れも多くの場合低純度の粉末状 DNA 標品を得たに過ぎなかつた。とくに細胞破壊手段としての物理的方法は、

当然のことながら同時に DNA 分子の低分子量化を招米するため高重合 DNA の調製を期待することができなかつた。

細菌のうちでもある種のもは界面活性剤のみで細胞膜が壊れるとの報告もあるが、³⁾ 本実験に供した菌体は、デオキシコール酸, SDS に対する抵抗性高く溶菌現象を観察できなかつた。

一般に、細菌の DNA 含量は極めて低いこと、分離操作中に菌体内酵素による分解を受けやすいこと等のため *in vivo* におけるような高分子量を持つた標品を調製することが甚だ難しく、これらの難点を克服する新しい調製法が待たれていた。当研究室において、先に家蚕 DNA の調製に成功したが、⁴⁾ このたび *B. subtilis* 生菌体を材料とし、本菌がリゾチム感受性であることを利用して高純度糸状 DNA の分離調製法を確立することができたのでここに報告する。

実験材料および方法

1. 供試菌株および培養法

供用した菌は、*Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto K-49 である。本菌は元米、福木氏によりアミラーゼ生産菌として黒大豆より分離されたグラム陽性の桿菌である。⁵⁾ 菌体の培養には、下記組成 (濃度は最終%) の MI 培地⁶⁾ を用い 30°C の恒温器中で 18 時間振盪培養した。

MI 培地: 大豆粕 (アルカリ抽出液) 5.0%, 可溶性でん粉 1.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, KCl 0.02%, pH 7.0.

振盪培養菌を冷凍遠心分離器により遠沈後、沈澱を生理食塩水で洗浄して、さらに 8,000 r.p.m. で 20 分間遠心分離し菌体を集めそのままいしは凍結 (一夜 -20°C に保存) したものを実験に供した。

2. 供試試薬

リゾチーム：市販ニワトリ卵白から直接結晶法⁹⁾により調製，等電点結晶を数回再結して使用したがその凍結乾燥標品をも用いた。

p-アミノ安息香酸ナトリウム (sodium p-aminosalicylate, PAS と略記)：第一製薬製品を用いた。

2-エトキシエタノール：東京化成工業薬品製を用いた。

フェノール：試薬一級品を使用しても，しばしば得られた DNA 標品が着色したので蒸留して 180°C の溜分をとり，水で 90% フェノールとして用いた。

Dデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate, SDS と略記)：Duponol C (和光純薬製品)を熱いエタノールに溶かし，熱いうちに適量 0°C におくと結晶が析出する。2度再結して結晶をエーテルで数回洗って乾燥したものを用いた。

ストレプトマイシン：結晶硫酸ジヒドロストレプトマイシン (武田薬品製)を用いた。

3. 実験方法

実験操作中の除蛋白法，脱水乾燥法，化学分析および諸数値の測定は前報¹⁾に従った。

実験，結果および考察

実験 I *B. subtilis* 生菌 115 g を 0.05 M 磷酸緩衝液-0.01 M クエン酸ソーダ-0.5 M 蔗糖混液 (pH 7.0) 1150 ml に懸濁する。クエン酸ソーダは実験操作中の DNase 作用を抑制するために，また蔗糖はリゾチーム処理によつて生ずるフロトプラストを安定にするために加えた。懸濁液を 37°C に保ち，リゾチーム 1 g を加え攪拌しながら 30 分間作用させた。溶菌した懸濁液を二つに分け，一方 (650 ml) は動物組織からの DNA 調製のもつとも古典的な方法として知られている塩化ナトリウム法により，¹⁰⁾ もう一方 (500 ml) は最近 Kirby 氏等によつて開発され優れた DNA 調製法として注目されている高濃度フェノール法¹¹⁾によつて DNA 調製を試みた。前者を実験 I-1，後者を実験 I-2 として示す。

実験 I-1 上に記した溶菌液を急冷し，2倍容の 95% アルコール中に注入し，淡黄褐色糸状沈殿を得た。これをガラス棒に巻きつけて分離し，70% アルコールで洗浄後，3,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して集めた。この沈殿を 2 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダで一晩 4°C にて抽出した。得られた核蛋白質溶液をクロロホルム-オクタールアルコール (8:1)¹²⁾ で蛋白

ゲルを生じなくなるまで繰り返し除蛋白した後，2倍容アルコール中に注ぎ，粉末状灰褐色沈殿を得て，常法通り脱水乾燥した。収量は 199 mg であつた。(標品 I-1)。標品 I-1 の分析値が第 1 表に示した。

本標品は糸状物として得ることができなかつた。しかしアセトン乾燥菌体を材料として DNA 調製を行なつた標品^{1,2)}と比較すれば，塩化カルシウム処理による精製¹³⁾を行なつていないにもかかわらず本標品は DNA 含量の増加にみるべきものがあつた。この原因として考えられることはアセトン乾燥菌体としてではなく，培養後直ちに集菌した新鮮菌体を用いたことにあるとみて良いと思う。アミラーゼを生産している工場より恵りを受けたアセトン乾燥菌体を材料とすれば，同一培養条件の多量の菌体を利用して実験，比較できる利点はあるが，アセトン乾燥菌体の保存の過程における DNA の分解による変質は避けられないであろう。

実験 I-2 溶菌液 500 ml に PAS を 6% になるように加え，さらに 90% フェノール 500 ml を加えて室温で 1 時間攪拌後，3,000 r.p.m. で 30 分間遠心した。遠心分離管は第 1 図のように上から透明褐色水溶液層，淡黄褐色のゲル状蛋白質層，フェノール層，最下層の沈殿に分かれた。まず 530 ml の水溶液層を傾斜法，あるいはピペットで分離採取しこれに同容のエトキシエタノールを加えたがわずかに沈殿を生じただけで糸状 DNA は得られなかつた。しかしこの状態

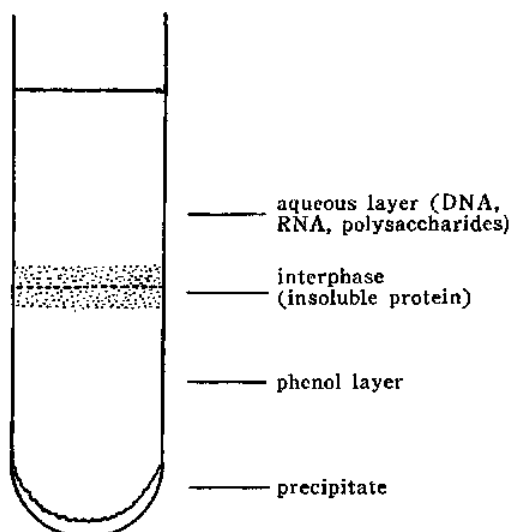


Fig. 1. Appearance of the separation of the extract of *Bacillus subtilis*.

Table 1.

Preparation	Wave length		E (0.01 %)			ε (P)		P (%)	DNA* (%)	RNA* (%)
	Max.	Min. (mμ)	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.			
I-1	259	234	0.405	0.212	1.91	2890	1510	4.2	30.4	8.1
I-2a	259	233	0.350	0.172	2.06	1720	850	6.3	34.3	10.4
I-2b	260	232	0.530	0.257	2.06	4320	2090	3.8	49.3	6.6

* The figures are expressed by the amounts of nucleic acids corresponding to the color intensities developed by cysteine-H₂SO₄ or orcin-HCl reaction.

で一夜静置するとかなりの沈殿を生じたので遠沈して集め灰白色粉末沈殿を得た。これを 0.14 M NaCl 中に懸濁して洗浄、遠心分離して沈殿を集め 1M NaCl で DNA 抽出を試みた。この抽出液を遠心分離し上清と沈殿に分け上清を繰り返して除蛋白した後 2 倍容のアルコールに注いだが沈殿は得られなかつた。一方、沈殿は常法により脱水乾燥すると灰白色粉末となつたが、この標品は DNA を含んでいなかった。

フェノールを加えて遠心分離した第 1 層 (水溶液層) は DNA を含まなかつたので蛋白質層と思われる第 2 層を検討してみた。この層を取り出し直ちに除蛋白操作を行ない、これを繰り返して 3 回行なつた。除蛋白溶液 250 ml を 2 倍容の 95% アルコール中に注ぐと灰白色糸状沈殿を生じた。ガラス棒に糸状物を巻きつけてとりだし 100 ml の 2 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダ中にホモゲナイズして一夜冷蔵庫中に静置し充分抽出した後、常法により除蛋白を 13 回反覆して除蛋白した溶液 63 ml を得た。これを 2 倍容の 95% アルコール中に注ぐと糸状物が得られたかにみえたが、得られたものは灰白色の粘潤なゴム状物質であつた。脱水乾燥して 185 mg の標品 I-2 a を得た。

次に本標品に対し、前報家蚕幼虫組織 DNA の調製⁶⁾のさいその糸状化に大きな効力を示した塩化カルシウム処理¹³⁾を試みた。すなわち、100 mg の標品 I-2 a を 20 ml の 10% CaCl₂ に懸濁し、10,000 r.p.m. で 30 分間遠心分離して上清を得た。沈殿はさらに 10% CaCl₂ 5 ml に懸濁し再抽出を行ない、同様に遠心分離しがかなりの量の白色不溶物を生じた。得られた無色透明な上清に 1/3 容の 95% アルコールを加え、白色糸状沈殿を得た。以下常法により塩濃度を上げた後除蛋白、脱水乾燥を行ない、仔牛胸腺 DNA 標品と同じような白色糸状 DNA 37.3 mg を得た。(標品 I-2 b)。標品 I-1 と同じく標品 I-2 a, I-2 b の若干の分析値を第 1 表に示した。

標品 I-2 a の調製において脱水乾燥にしたがつて糸状沈殿がゴム状になつたが塩化カルシウム処理によ

り標品 I-2 b は繊維状の沈殿となり、初期の目的とした DNA 含量のかなり高い糸状物の分離調製に初めて成功した。

我々は *Escherichia coli* のリゾチーム溶菌液から高濃度フェノール法で DNA を調製したところ、DNA 含量 68% という従来のものに比べて割合に DNA に富む標品を得ることができた。*B. subtilis* の DNA 調製にも利用すべくさらに検討を加えた。

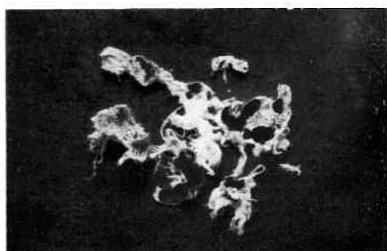
実験 II 本実験は実験 I-2 の再現性を検討するほかに、エトキシエタノール処理を単にアルコール処理で代用できるのではないかという見地につて試みたものである。新鮮な菌体 80 g を 200 ml の 0.2 M NaCl-0.1 M クエン酸ソーダ¹⁴⁾に懸濁して 37°C に保ちリゾチーム液 50 ml を加えて 10 分間攪拌しながら溶菌した。

注) 実験 I では蔗糖をプロトプラストの安定をはかるために加えたが、塩化ナトリウムで代用してもその後の操作に影響はなかつた。

透明高粘潤となつた液を急冷後 2 倍容の 95% アルコールに注入して、得られた沈殿を遠心分離によつて分画し 6% PAS 溶液 350 ml に懸濁した。懸濁液に 90% フェノール 350 ml を加えて室温で 90 分間攪拌後、10,000 r.p.m. で 20 分間遠心分離を行なつた。上清を 2 倍容のアルコール中 (比較的高価なエトキシエタノールの代りとして用いた) に注ぎ、糸状物を分離して 2 M NaCl 200 ml に懸濁して 2 日間 4°C に放置した。クロロホルム-オクタールアルコールで除蛋白を繰り返して、もはや蛋白質のゲルが見られなくなるまで 14 回行なつた。除蛋白した液を 2 倍容のアルコール中に注いで白色糸状沈殿を得、10% CaCl₂ 60 ml に懸濁して不溶物を遠沈除去した。得られた透明上清に 1/3 容のアルコールを加え DNA のカルシウム塩を糸状に得た。ついで、50 ml の 2 M NaCl に溶かしてソーダ塩に代えた後、これを 2 倍容のアルコールから糸状に分離し得られた白色糸状 DNA (Na 塩)

Table 2.

Preparation	Wave length		E (0.01 %)			ε (P)		P (%)	DNA (%)	RNA (%)
	Max. (mμ)	Min. (mμ)	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.			
II-1	260	231	1.660	0.715	2.31	7040	3030	7.3	60.1	16.0
II-2	260	231	1.935	0.790	2.44	6730	2750	8.9	90.1	5.3

Fig. 2. Preparation of *B. subtilis*-DNA-II-1.

を脱水乾燥して 60 mg の標品 II-1 を得た。本標品は第 2 表に示すようにかなり DNA 含量の高いものであつた。本標品を第 2 図に示す。

続いて、同じフェノール法により、菌体処理量を増し 180 g の生菌体を用いて DNA 調製を行なつたが脱水乾燥した標品が Waring blender の鉄サビにより着色したため脱鉄を目的として 1% EDTA-0.2 M ク

エン酸ソーダ処理を行なつた。このキレート試薬による処理後 3M 酢酸ソーダ (pH 7.0) で塩濃度を上げ、さらにもう一度 CaCl₂ 処理を行なつた。得られた DNA のカルシウム塩を常法によりソーダ塩に代えてから脱水乾燥し 30 mg の白色糸状沈殿 (標品 II-2) を得た。この標品は 90.1% と非常に DNA 含量の高いものであつた。標品 II-1, II-2 の水溶液の吸収スペクトルおよび分析値を第 3 図, 第 2 表に示した。

本実験によりエトキシエタノールの代りにアルコールを利用できること、ならびにリゾチーム処理は短時間で十分な結果を与えること等確かめ得たことのほかに、標品 II-1, II-2 は DNA 含量の高い動物組織から得られた標品と比較しても何らの遜色のないものであることを知つた。さらに不測の結果から行なつたキレート試薬処理が DNA の精製手段として大きな効果を治めた点に注目されるべきであろう。

実験 III 実験 I-2, II を通じてフェノール法による DNA 調製を行なつてきたが、DNA 調製法としてはこのほかに、仔牛胸腺 DNA 調製法として賞用されている SDS,¹⁴⁾ 細菌 DNA 調製法として報告のあるストレプトマイシン沈殿法¹⁵⁾等が知られている。

凍結した生菌体 170 g をリゾチーム溶菌処理、アルコール添加によつて得た沈殿を三分して (一分はほぼ 55 g 菌体に相当)、フェノール法、SDS 法およびストレプトマイシン法を同時に行なつて比較検討した。

実験 III-2 実験 II に記したフェノール法を用いて 14 mg の DNA 標品 III-1 を得た。

実験 III-2 リゾチーム溶菌液のアルコールによる沈殿 750 ml の 0.14 M NaCl 中にホモゲナイズし、5% SDS 溶液 (45% アルコールに溶かしたもの) 90 ml を加え、室温で 2 時間攪拌した。白濁した混液に、乳鉢でよく砕いた 50 g の NaCl を加え 1M とし、さらに 10 分間攪拌してから 10,000 r.p.m. で 20 分間遠心分離した。得られた上清を等容の 95% アルコール中に注ぎ、白色糸状沈殿を得た。この沈殿をガラス棒に巻きつけて取り、さらに短糸状のガラス棒に巻きつかない沈殿は傾斜法によつて集めた。これを脱水

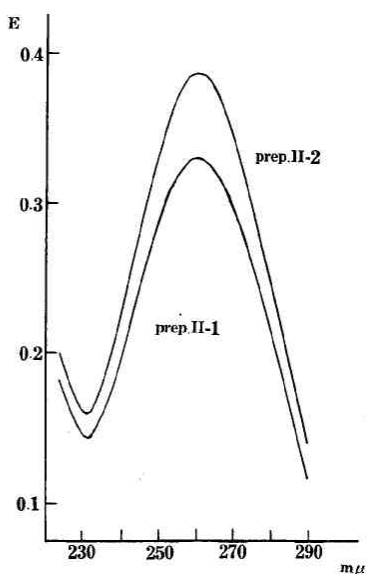


Fig. 3. UV absorption spectra of prep. II-1 and prep. II-2. Absorption were estimated on 0.002% solution of the preparations.

Table 3.

Preparation	Wave length		E (0.01 %)			ε (P)		P (%)	DNA (%)	RNA (%)
	Max. (mμ)	Min. (mμ)	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.			
III-1	261	235	0.900	0.485	1.86	3440	1860	8.1	43.0	11.3
III-2	261	235	1.180	0.575	2.05	3850	1860	9.5	53.0	13.6
III-3	261	235	0.670	0.325	2.06	5970	1970	5.1	32.0	11.6

乾燥して 440 mg の標品を得たが直ちに SDS 法による精製を今一後試みた。すなわちこの標品を 175 ml の H₂O に溶かし、16 ml の 5% SDS 溶液を加えて 1 時間室温で攪拌後、11 g の NaCl を加え遠心分離した。上清に等容のアルコールを加えて糸状物を分離し、脱水乾燥によりゴム状沈殿 250 mg を得た。続いてこの標品にも塩化カルシウム処理を試みた。75 ml の 10% CaCl₂ に沈殿をホモゲナイズして溶かし、不溶物を遠心分離して除いた後、上清に 1/3 容のアルコールを加え白色糸状沈殿を得た。沈殿はゴム状であった。収量 47.4 mg 標品 III-2

実験 III-3 生菌体 55 g に相当するアルコール沈殿を水に懸濁して 200 ml とした。

これに 6 ml の 0.1M ストレプトマイシン (*in vivo* における DNA の 80% が沈殿するという報告¹³⁾がある)を加えて生じた沈殿を集め、常法により除蛋白、脱水乾燥して標品 III-3 8 mg を得た。

標品 III-1, III-2 および III-3 の分析値を第 3 表に示す。

実験 III-1, III-2, III-3 で得られた標品の収量、DNA 含量について比較してみると、SDS 法、フェノール法、ストレプトマイシン法の順となつた。この順序でこれらの方法の優劣を決めるのは、除蛋白の程度や精製の相違があるので早計である。CaCl₂ 処理後に除蛋白操作を行なえばかなりの好結果がもたらされていることを考慮するとき、本実験で試みた SDS 法にはこの CaCl₂ 処理後の除蛋白操作を行なっていないので、さらに高い純度の標品が得られる期待もてる。ストレプトマイシン法について述べるには、ただ一度の実験では不充分ではあるが糸状に得られた点注目される。これらの比較実験の結果をみて次のごと

く再検討した。

実験 IV SDS 法による DNA 調製は室温で操作が行なえてなおかつ簡単なこと、比較的高価な試薬を必要としないこと等の大きな利点も持っている。操作が簡単であることは収量が高くなりうるということでもあるので、この方法を *B. subtilis* の DNA 調製に適用するよう改良を試みたのが、実験 III-2 であつた。これは仔牛胸腺 DNA 調製の場合と同程度の容量で行なつたものであるが、*B. subtilis* の DNA 含量が仔牛胸腺のその含量に比べてはるかに少ない点を考えれば原報¹¹⁾通りの方法では無理な点が多かつた。Marmur 氏は SDS を用いて種々の微生物から DNA 調製を行なつているので、¹⁴⁾この方法を若干改良して次のように調製を試みた。

50 g の凍結状態の新鮮な菌体を 250 ml の 0.1M EDTA—0.15 M NaCl (pH 8.0) に懸濁し洗浄した。洗浄菌体を同じく 0.1 M EDTA—0.15 M NaCl (pH 8.0) 250 ml 中に懸濁し、リゾチーム 100 mg を加えて 37°C で 60 分間攪拌しながら溶菌した。溶菌液に 25% SDS 溶液 40 ml を加え 60°C に 10 分間保ち急冷後、1M になるように過塩素酸ソーダを 70 g 加えた。540 ml となつた全量を 2 l の酸液ロットに移し、同容のクロロホルム—イソアミルアルコール (24:1) を加えて 30 分間振盪、10,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離した。水溶液層 420 ml をピペットで吸いとり、2 倍容のアルコール中に注いで生じた沈殿をガラス棒で巻きとつて脱水乾燥した。得られた白色糸状沈殿は固くもろかつた。収量 337 mg (標品 IV) 分析結果を第 4 表に示す。

本標品は期待したような結果は得られなかつたが糸状物として分離することには一応成功したのでこの段

Table 4.

Preparation	Wave length		E (0.01 %)			ε (P)		P (%)	DNA (%)	RNA (%)
	Max. (mμ)	Min. (mμ)	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.			
IV	257	240	0.470	0.330	1.42	2070	1460	7.0	20.3	6.6

階にとどめた。収量はかなり良いのでさらに CaCl_2 処理、除蛋白を行なつて精製して検討する必要があるであらう。

これらの標品はさらに RNase 処理によつて夾雑する RNA を、Protease 処理によつて蛋白を除くことができるが、これらの過程は何ら *B. subtilis* に特有なものではなく他の組織からの DNA 精製に用いられている常法に従えば良い。我々の *B. subtilis* から高純度の糸状 DNA 標品を調製する初期の目的はほぼ達成された。

要 約

Bacillus subtilis からの DNA 調製法として、塩化ナトリウム法、フェノール法、SDS 法およびストレプトマイシン法を各々比較検討したが、使用試薬、操作法、結果等から実際の実験に供し得るのはフェノール法と SDS 法の二法にとどまるようであつた。なかでも、塩化カルシウム処理を組み合わせた改良高濃度フェノール法によつて、従来調製することができなかつた *Bacillus subtilis* の高純度糸状 DNA 標品の調製に成功した。

この標品を得るために用いた高濃度改良フェノール法による標準的な調製法の概要を示す。

まず、アミラーゼ生産菌である *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto K-49 菌を 30°C で 20 時間振盪培養後、遠心分離により菌体を集め、 0.14M 塩化ナトリウム溶液で数回洗浄し、最後は $8,000\text{ r.p.m.}$ で 20 分間遠心分離する。このようにして得られた新鮮な菌体を、 0.14M 塩化ナトリウム— 0.014M ケエン酸ナトリウム溶液に懸濁（湿潤菌体 1g あたり $3\sim 5\text{ml}$ ）して、リゾチム（懸濁液 1ml あたりリゾチム凍結乾燥標品 1mg ）を加えて攪拌しながら 37°C で $5\sim 10$ 分間溶菌させた後急冷し、2倍容の 95% アルコールに注入して生じた沈殿を遠心分離によつて集める。沈殿を 6% の PAS 水溶液中（最初の湿潤菌体は 1g あたり 4ml ）にホモゲナイズして、さらに同容の 90% フェノールを加えて室温で 90 分間攪拌、全量を $10,000\text{ r.p.m.}$ 20 分間の遠沈により分離した透明な上清を、2倍容のアルコール中で沈殿させると白色

の糸状物が沈殿する。この沈殿をおよそ 50 倍量の 2M 塩化ナトリウム溶液に溶かし常法に従い蛋白ゲル皮膜を生じなくなるまでクロロホルム—オクチルアルコール ($8:1$) 処理を繰り返す。ついで除蛋白した溶液を 2 倍容アルコールに添加して糸状物を再び沈殿させ、20 倍量の 10% 塩化カルシウム溶液に溶かし、 $10,000\text{ r.p.m.}$ で 30 分間遠心分離する。上清に 3 分の 1 容のアルコールを加えて生じる糸状物を採取し、ついで塩化ナトリウム溶液に溶かしてソーダ塩とし、アルコール再沈殿、脱水、エーテル洗浄、減圧乾燥により、高純度糸状 DNA 標品を得た。

終りに本研究につき終始懇篤な御指導を賜つた本学山藤一雄教授ならびに大村浩久助教授に謹んで感謝の意を表します。

文 献

- 1) 大村浩久・渡辺健治・徳永純一, 1961. 九大農芸誌, **18**: 381.
- 2) 大村浩久・渡辺健治, 1961. 九大農芸誌, **18**: 399.
- 3) 渡辺健治, 1962. 九大農学部農産製造学研究室報告, 第 1 号.
- 4) Kornberg, A., 1961. Enzymatic synthesis of DNA, John Willey & Sons, Inc., 11.
- 5) Hotchkiss, R. D., 1957. Method in Enzymology, Academic Press Inc., **3**: 692.
- 6) 内田泰・箆島豊・秋山武士・大村浩久, 1963. 九大農芸誌, **20**: 329.
- 7) 福本寿一郎, 1945. 農化, **19**: 487.
- 8) Watanabe, K. and Yamafuji, K., 1961. Enzymologia, **23**: 353.
- 9) 天野恒久・加藤慶二郎, 1961. 酵素研究法, **2**: 154.
- 10) Mirsky, A. E. and Pollister, A. W., 1946. J. Gen. Physiol., **30**: 117.
- 11) Kirby, K. S., 1957. Biochem. J., **66**: 495.
- 12) Sevag, H. G., Lackman, D. B. and Smolens, J., 1938. J. Biol. Chem., **124**: 425.
- 13) Chargaff, E. and Zamenhof, S., 1948. J. Biol. Chem. **173**: 327.
- 14) Kay, E. R. M., Simons, N. S. and Dounce, A. L., 1952. J. Am. Chem. Soc., **74**: 1724.
- 15) Cohen, S. S. and Lichtenstein, J., 1960. J. Biol. Chem., **235**: PC55.
- 16) Marmur, J., 1961. J. Mol. Biol., **3**: 208.

Summary

A highly purified DNA in fibrous state was prepared from the cells of amylase-producing bacteria, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto K-49. The bacteria grown to the

logarithmic phase of their growth cycle were harvested by centrifugation and washed with cold 0.14 M saline solution.

The procedure for the isolation of DNA was designed for 100 g of wet packed cells. The cells were suspended in 500 ml of 0.14 M NaCl containing 0.14 M sodium citrate. The bacteria were not lysed by a treatment of deoxycholate or SDS but sensitive to lysozyme. Therefore, the cells were lysed by 100 mg of egg-white lysozyme under agitation for 10 minutes at 37°C. After incubation, this viscous lysate was poured into 2 volumes of ice-cold ethanol and centrifuged. The sediment was homogenized in 400 ml. of 6% PAS, then, the suspension was mixed with an equal volume of 90% phenol and stirred for 90 minutes at room temperature. The emulsion was centrifuged at 10,000 r.p.m. for 20 minutes. The resulting upper aqueous phase was removed by suction and poured into 2 volumes of cold ethanol. A white fibrous mass was wound up on the end of stirring rod. The precipitate was dissolved in 50 ml of 2 M NaCl, and deproteinized with chloroform-octylalcohol (8:1) until very little protein was seen at the interface.

After the series of deproteinization, the fraction of DNA was precipitated with ethanol and dispersed in 20 ml of 10% CaCl_2 and centrifuged at 10,000 r.p.m. for 30 minutes. The supernatant fluid was poured into 0.3 volume of ethanol and the precipitate was discarded. The fibrous material was removed with a glass rod and dissolved in 2 M NaCl.

Finally, Na-DNA was spooled on a glass rod as a white threadlike precipitate from the solution with 2 volumes of 95% ethanol and dried *in vacuo* after dehydration of ethanol.

Thus, fibrous DNA of 90% purity was obtained. The yield of purified product was satisfactory.

Agricultural Chemistry Institute,
Kyushu University, Fukuoka, Japan