

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	コリネ型細菌における細胞分裂と細胞増殖の共役機構に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	木嶋伸行
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第3773号, 授与年月日:1998年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第3773号, Conferred date:1998/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

コリネ型細菌における細胞分裂と細胞増殖の共役機構に関する研究

指導教官 永井 和夫 教授
和地 正明 助教授

バイオテクノロジー専攻

木嶋 伸行

コリネ型細菌における細胞分裂と細胞増殖の共役機構に関する研究

目次

第一章		
序論		1
第二章		
シャトルベクターpC2 の機能解析		7
第三章		
コリネ型細菌の細胞分裂機構の解析		25
第四章		
コリネ型細菌における Penicillin-Binding Proteins (PBPs)とグルタミン酸生		
産の関係		37
第五章		
<i>ftsZ</i> 遺伝子の分離と解析		56
第六章		
<i>ftsZ</i> 変異株の分離と解析		70
第七章		
総括		91
参考文献		96
謝辞		106

序論

コリネ型細菌 (coryneform bacteria) は、非運動性で孢子形成能を持たないグラム陽性桿菌で、自然界に広く分布している。コリネ型細菌には非病原性の *Corynebacterium glutamicum* のほか、人や家畜に対し病原性を示す *Corynebacterium diphtheriae* や *Corynebacterium parvum* がある。また、*Mycobacterium* 属、*Nocardia* 属、*Rhodococcus* 属などの細菌と近縁である。coryne とは club (棍棒) を意味し、その名は細胞形態に由来する。

C. glutamicum に代表されるコリネ型アミノ酸生産菌(amino acid producing coryneform bacteria)の研究は、1950 年代に我国の研究者(Kinoshita *et al.*, 1957)が自然界からグルタミン酸を生産する菌 *Micrococcus glutamicus* (後に改変され *Corynebacterium glutamicum*)を分離したことにより始まった。本菌の発見によりグルタミン酸の製法がこれまでの小麦グルテンの加水分解から発酵法に転換された。さらに、この株からリジン(Kinoshita *et al.*, 1957)、スレオニン(Kinoshita *et al.*, 1957)やその他の多くのアミノ酸等の一次代謝産物の実用生産菌が変異育種された。その結果、1970 年代にアミノ酸発酵、あるいは代謝制御発酵という我国独自の輝かしい工業的生産方法の確立をもたらした。

本細菌は桿菌であるが *Escherichia coli* の様な典型的な桿菌ではなく、非対称のまさしく棍棒の形をしている。また、スナッピングと呼ばれる独特な分裂様式を示し、隔壁が形成されたあとに細胞が折れ曲がるように移動して二つの娘細胞に分裂し、その結果特徴的な V 字型の細胞対を生じる(Fig. 1-1)。*C. glutamicum* は上述のようにグルタミン酸の生産菌として木下らによって分離された。その後、いくつかのグループによって独立に類似のグルタミン酸生産菌として *Brevibacterium lactofermentum*、*Brevibacterium flavum* 等が分離されたが、近年、これらはすべて *C. glutamicum* に再分類されている。

コリネ型細菌におけるグルタミン酸の生産性向上を目的として、生合成系の解明が進められた(Kinoshita *et al.*, 1957a, Kinoshita *et al.*, 1958)。これらを基に生合



Fig. 1-1 Photomicrograph of Gram stained *Corynebacterium glutamicum* ATCC31831

成に分岐点を持つものでは栄養要求性変異株の作出を行った。また代謝経路にはフィードバック調節や抑止機構が存在する。そこでこれらを回避するため非代謝性アナログ耐性株の作出がなされた(Adelberg 1958、Shiio *et al.*, 1970、Sano *et al.*, 1970、Araki *et al.*, 1971)。またその一方で、培養条件も重要な研究対象とされてきた。コリネ型細菌は、その増殖に biotin を要求する。グルタミン酸の産生は biotin を過剰に含む培地中では認められず、biotin を制限する必要がある(Shiio *et al.*, 1962、Itagaki *et al.*, 1960)。しかし、発酵生産の原料となる廃糖蜜には多量の biotin が含まれることから、biotin 存在下でグルタミン酸産生を誘導する化合物の探索が精力的におこなわれ、penicillin (Nunheimer *et al.* 1970)やある種の界面活性剤(Takinami *et al.* 1965)の効果が見いだされた。1980 年代までは、これらの処理が細胞表層に阻害的に作用するという共通のメカニズムをもつことから、グルタミン酸の細胞外への蓄積は細胞表層の透過性の変化にともなう細胞外への漏洩ではないかと考えられてきた。しかしながら近年、細胞表層の透過性の上昇では説明のできない知見として、グルタミン酸特異的な輸送タンパク質(Gutaman *et al.*, 1992、Hoischen *et al.*, 1990、Kramer *et al.*, 1994、Plakunov *et al.*, 1992)が報告されている。

biotin 制限や penicillin 処理、界面活性剤処理によりグルタミン酸産生が誘導されている時、細胞増殖は停止した状態にある。biotin 制限は主に脂肪酸合成に影響を与えと考えられる。界面活性剤処理も、特定の脂肪酸エステルのみが効果を示すことから、界面活性剤としての効果ではなく、脂肪酸合成への影響と考えられる。最近、界面活性剤感受性変異を回復させる遺伝子として脂肪酸合成系に関わる biotin 酵素の相同体がクローン化された(Kimura *et al.*, 1996)ことも、この考えを支持するものである。これらの処理では、脂肪酸合成が阻害された結果として、細胞増殖が抑えられたと考えられる。一方、penicillin は細胞壁を構成する Peptidoglycan の合成に関与する Penicillin-Binding Proteins (PBPs)の阻害剤である。増殖中の *E. coli* に penicillin を添加すると速やかに溶菌し培養液の濁度は低下する。コリネ型細菌 *C. glutamicum* ATCC31831 に MIC に相当する 0.1 mM の penicillin を添加すると濁度の上昇は停止するが溶菌には至らず、一見、定常状態が維持された(Fig. 1-2)。これ

は penicillin の作用機作を考えると極めて特異な事である。次に、果たして細胞壁合成が阻害されているか否かを確かめるために、penicillin 処理した菌体を 2 % SDS で処理した結果、急激な濁度の減少が認められた(Fig. 1-2)。未処理の菌体ではこのような減少は起こらなかった。これらのことから、*C. glutamicum* ATCC31831 への penicillin 処理により Peptidoglycan 合成は阻害されており、細胞壁には十分な傷が付いていると考えられる。増殖の抑制もこれに起因すると考えられる。また、コリネ型細菌の細胞を溶菌に抵抗性に行っているのは、SDS 可溶性成分であり、おそらくコリネ型細菌の特徴の一つでもあるミコール酸の膜がその実体と考えられる。

以上のことから次のような仮説を立てた(Fig. 1-3)。通常の条件下では 2 倍長に伸長した母細胞はスナッピングの末、二つの娘細胞になる。この際、グルタミン酸の細胞外への蓄積は起こらない。しかし biotin 制限、界面活性剤の添加、penicillin の添加により増殖を抑えられた細胞では、今まで、細胞の増殖に用いてきたエネルギーを別の系で消費するようにその流れを変える。少なくともその一つが細胞外へのグルタミン酸の蓄積と考えた。また同時にエネルギーフローに変化を与える要因として、細胞の増殖の停止(細胞分裂の阻害)がシグナルとして機能すると考えた。そこで、本研究ではコリネ型細菌における細胞の増殖とグルタミン酸産生の関係解明を目指し、分子遺伝学的、生化学的手法を用いその解析を行った。

本論文では、第二章で *E. coli* とコリネ型細菌で機能する効率的なシャトルベクターの開発を、第三章でコリネ型細菌に対する細胞分裂阻害剤の効果について示す。第四章では penicillin の作用とグルタミン酸の細胞外への蓄積との関係を解明するため、コリネ型細菌の PBPs の検出とその解析について示す。第五章では細胞分裂遺伝子の一つである *ftsZ* 遺伝子の分離と解析についてまた、第六章ではこの遺伝子を用いた温度感受性の細胞分裂変異株のスクリーニングと得られた変異株の解析について示す。第七章では本論文の総括を示した。

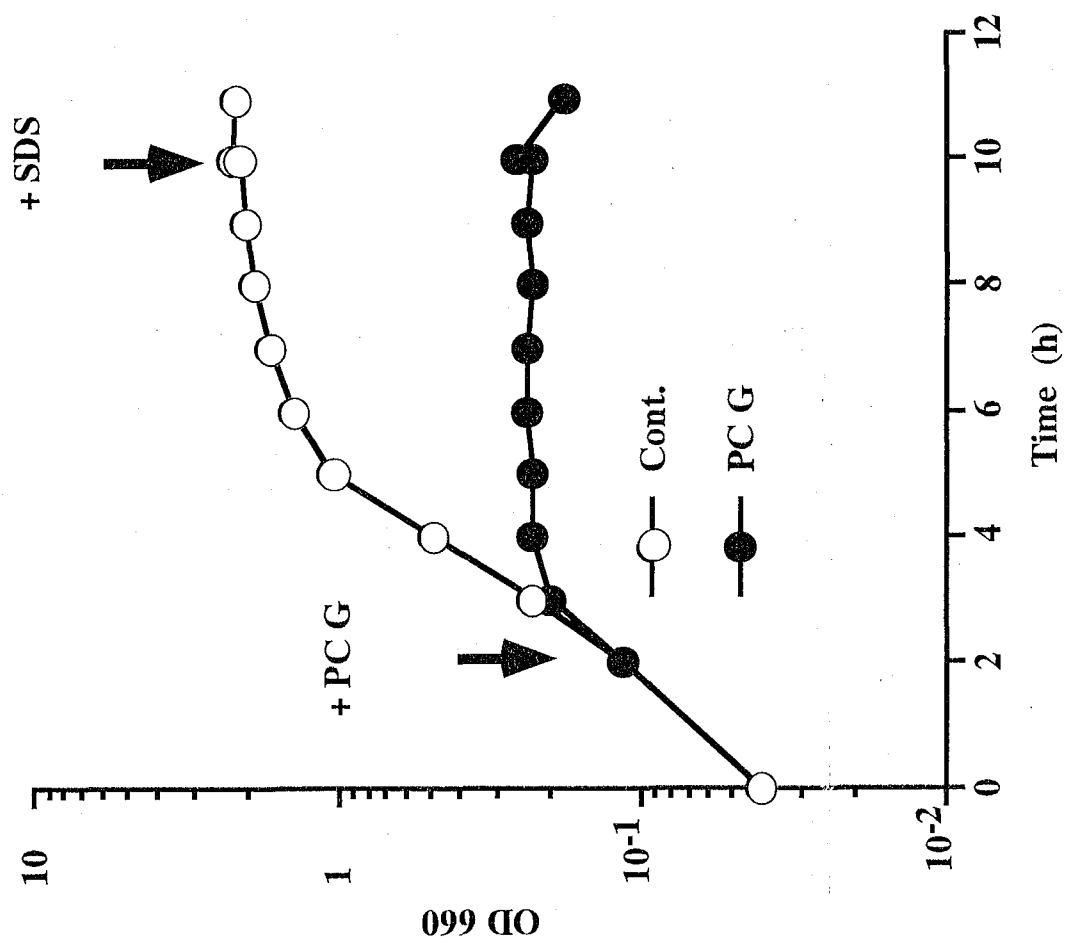


Fig. 1-2 Effect of penicillin G on cell growth of *C. glutamicum* ATCC31831.

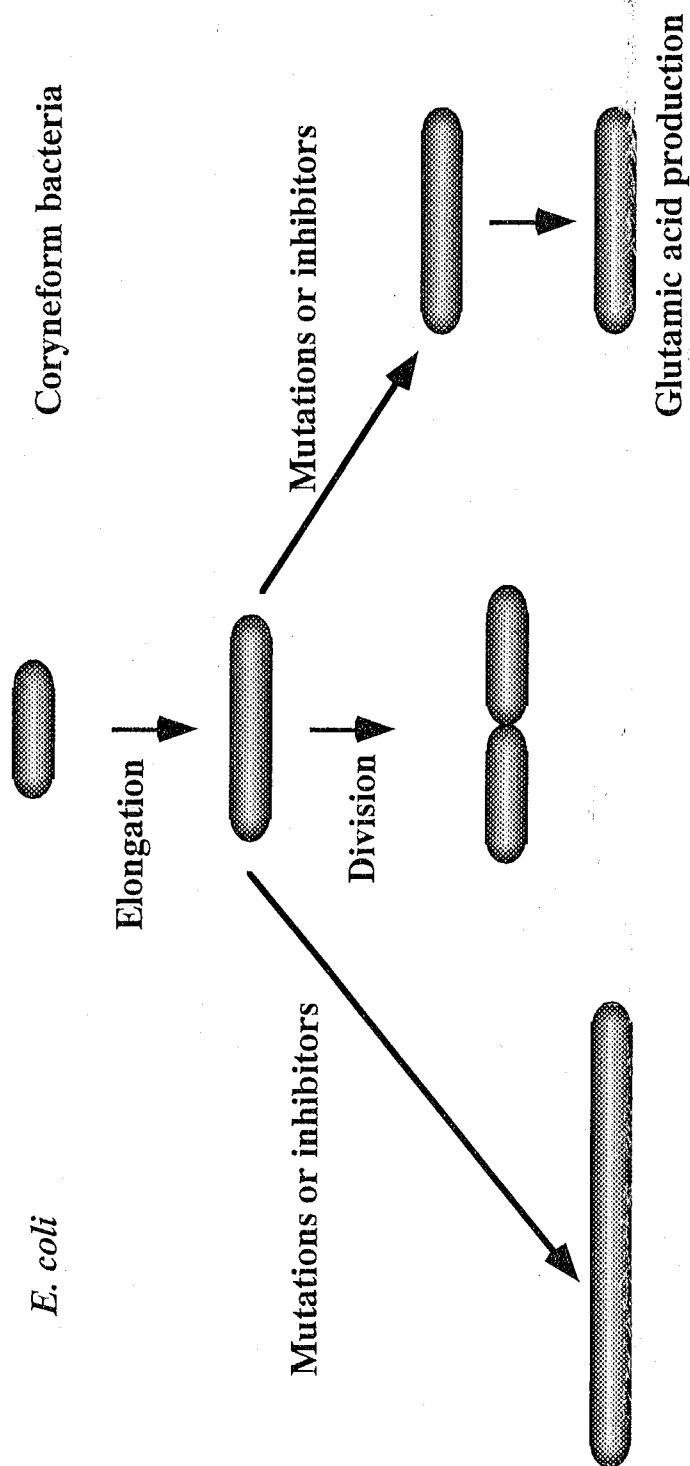


Fig. 1-3 Hypothetical model of the difference division fashion in coryneform bacteria and *Escherichia coli*.

シャトルベクターの機能解析

はじめに

コリネ型細菌における host vector 系(Martin *et al.*, 1987)、遺伝子破壊や遺伝子交換技術(Labarre *et al.*, 1993; Vertes *et al.*, 1993)また transposon mutagenesis systems (Vertes *et al.*, 1994)等は基礎的研究に多大なる貢献をただけでなく、グルタミン酸等のアミノ酸の生産性向上にも貢献してきた。これまでいくつかのコリネ型細菌より分離したプラスミドの報告はなされている(Miwa *et al.*, 1984、Sandoval *et al.*, 1985、Martin *et al.*, 1987)。しかしながら、その機能については未解明である。リジン生産能を持つ *Brevibacterium lactofermentum* ATCC21798 の潜在プラスミドである pBL1(Santamaria *et al.*, 1984)は、コピー数が多いことや、単一の制限酵素サイトを持つことからクローニングベクターの開発に用いられてきた。プラスミド pAM330 (Miwa *et al.*, 1984)、pWS101(Yoshihama *et al.*, 1985)および pGX1901(Smith *et al.*, 1986)はそれぞれ独立に分離され研究されてきたものであるが pBL1 と同一と考えられる。コリネ型細菌のプラスミドの多くは潜在プラスミドであるため選択マーカーを付加する事でその有用性を高めてきた。しかしながら *E. coli* とコリネ型細菌との間で自由自在に機能するシャトルベクターは *E. coli* の膨大な知見を利用できることからコリネ型細菌のクローニングシステムへの貢献度は大きいと考えられる。そこで、本章では潜在プラスミド pBL1 と *E. coli* ベクター pHSG298 からなるシャトルベクター pC2 における pBL1 の機能解析を行った。

材料と方法

○供試菌株および培養条件

E. coli K-12 strains JM109 [*recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1D(lac-proAB)* (F' *traD36 proAB lacI^qlacZ* D M15)], JM110 [*dam dcm supE44 hsdR17 thi leu rspL lacY galK galT ara tonA thr tsx D(lac-proAB)* (F' *traD36 proAB lacI^qlacZ* DM15)]を用い組換え DNA 操作ならびにシャトルベクターによる機能解析に用いた。コリネ型細菌として *C. glutamicum* ATCC31831 および *B. lactofermentum* ATCC21798 を用いた。全菌株は Lennox (L) broth (10 g/l polypeptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, 2 g/l glucose,

pH 7.2) (Lennox 1955)にて 30 °C で培養した。必要に応じ ampicillin (25 μ g/ml)、kanamycin (25 μ g/ml)および tetracycline (25 μ g/ml)を加えた。生育の確認は 660 nm の波長光における吸光値を測定することにより行った。

○顕微鏡観察

細胞の観察は平賀らの蛍光法と位相差法を組み合わせた方法(Hiraga *et al.*, 1989)にて行った。細胞をスライドガラス上に広げ、methanol による固定と poly-L-lysine による被覆を行った。固定した細胞は(DAPI) 溶液(5 mg/ml)で染色し、顕微鏡 (BH2、Olympus、Tokyo、Japan)観察した。

○プラスミド抽出および形質転換

プラスミドの抽出はアルカリ抽出法 (Birnboim *et al.*, 1979)に準じ行った。pBL1 (pAM330) (Fig. 2-1)は *B. lactofermentum* ATCC21798 より抽出した。*E. coli* ベクターpHSG298、pUC119 および pBR322 は宝酒造社製を pMW119 はニッポンジーン社製を用いた。組換え DNA 実験は主に JM109 を用いた。コリネ型細菌へのプラスミドの導入は JM110 より抽出したプラスミドを用いた。コリネ型細菌および大腸菌への形質転換はジーンパルサー(Invitrogen Electroporator II)により行い それぞれ Kurusu *et al.*, (1990)、Dower *et al.*, (1988)の方法に準じて行った。

○シャトルベクターの構築

B. lactofermentum ATCC21798 より抽出した pBL1(Fig. 2-1)の唯一の *Hind*III サイトを平滑化し大腸菌のベクターpHSG298 の *Hinc*II サイトに結合した。これによって得られたプラスミドを pC2(Fig. 2-2)と名付け、*E. coli* JM109 および JM110 に導入した。JM110 より抽出した pC2 を *C. glutamicum* ATCC31831 に導入した。また、pC2 の各種欠失断片を構築した(Fig. 2-5)。pDG11 は pBR322 の tetracyclin 耐性

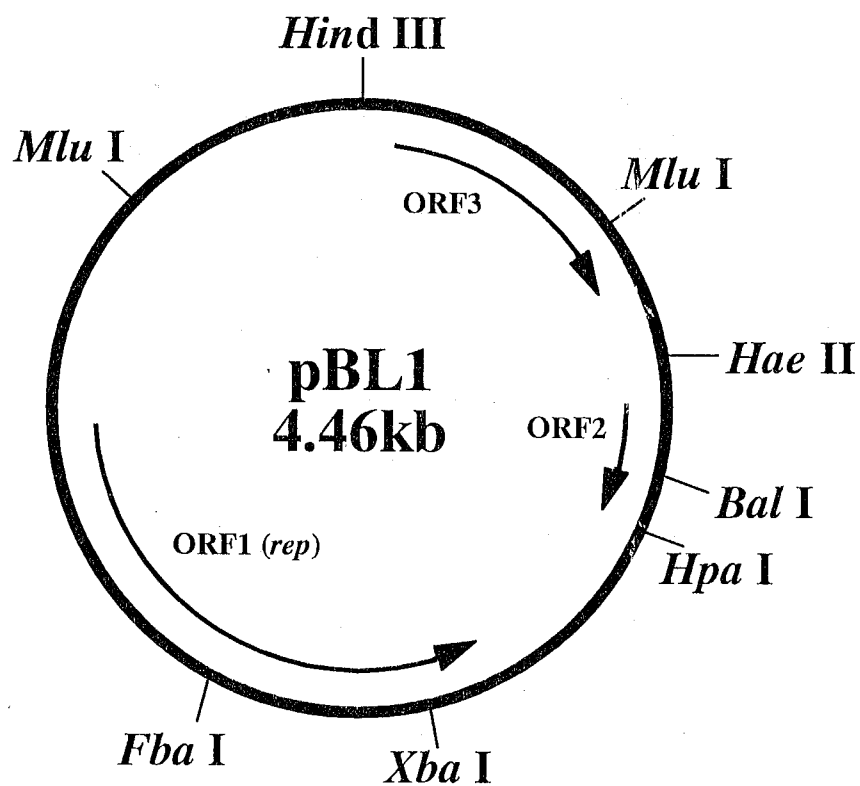


Fig. 2-1 **Structure of pBL1 from *Brevibacterium lactofermentum*.**

pBL1 was isolated as a cryptic plasmid from lysine-producing coryneform bacteria *B. lactofermentum* ATCC21798(Santamaria *et al.*, 1984).

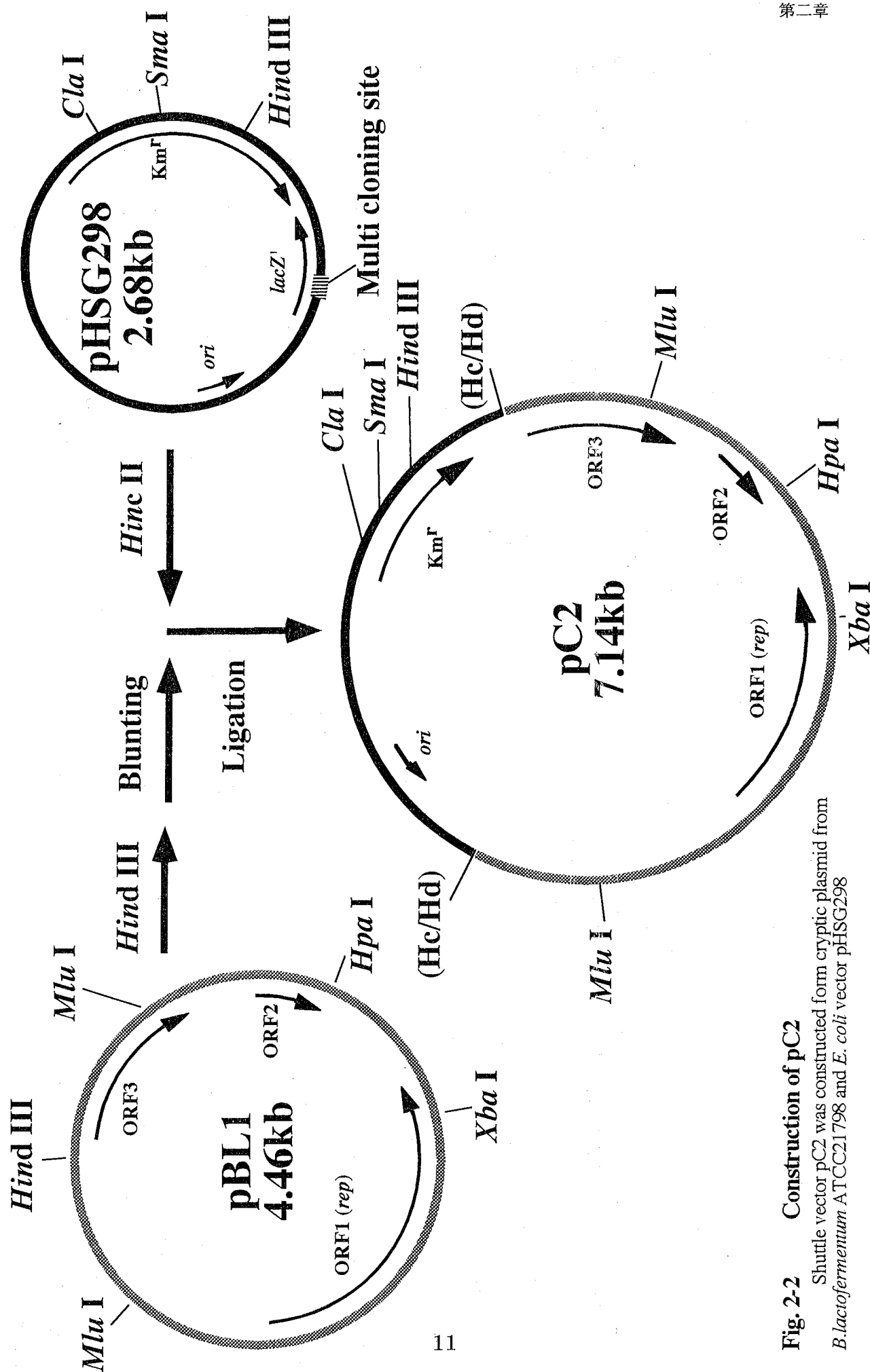


Fig. 2-2 Construction of pC2

Shuttle vector pC2 was constructed from cryptic plasmid from *B.lactofermentum* ATCC21798 and *E. coli* vector pHSG298

遺伝子断片(*Ssp*I - *Eco*T14I)を PCR で増幅し、その際に *Mlu*I サイトを付加した *tet* gene cassette を pDG2 の同一サイトに挿入し構築した。

○塩基配列の決定

塩基配列の決定は dideoxy 法(Sanger *et al.*, 1977)に従い、Automated Laser Fluorescent DNA sequencer (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden)および FITC ラベルした蛍光プライマーを用いて行った。

○*in vitro* タンパク質合成実験

in vitro でのタンパク質合成は DeVries *et al.*, (1967)に準じ prokaryotic protein expression kit (Amersham International plc, Buckinghamshire, England)および L-[³H] leucine を用いて行った。

結果

○pC2 による *E. coli* の生育阻害

B. lactofermentum ATCC21798 由来の pBL1 および *E. coli* ベクター pHSG298 からなるシャトルベクター pC2 による *E. coli* JM109 の生育阻害を見いだした。*E. coli* JM109 単独もしくは pHSG298 を保有した場合の Doubling time は 30°C において 50 分であったが、pC2 を保有した場合 75 分となった。また最終的な濁度も pC2 保有した場合は低い値を示した(Fig. 2-3)。蛍光法と位相差法を組み合わせた方法(Hiraga *et al.*, 1989)により対数増殖期の細胞の形態を顕微鏡下で観察したところ、pC2 を保有した大腸菌において著しい細胞の伸長化が認められた (Fig. 2-4)。また、同時に染色体の分配にも影響を示し、不当分配や大きくいびつな核様体が伸長化した細胞で認められた(Fig. 2-4)。*C. glutamicum* ATCC31831 のようなコリネ型細菌においては、本シャトルベクターは

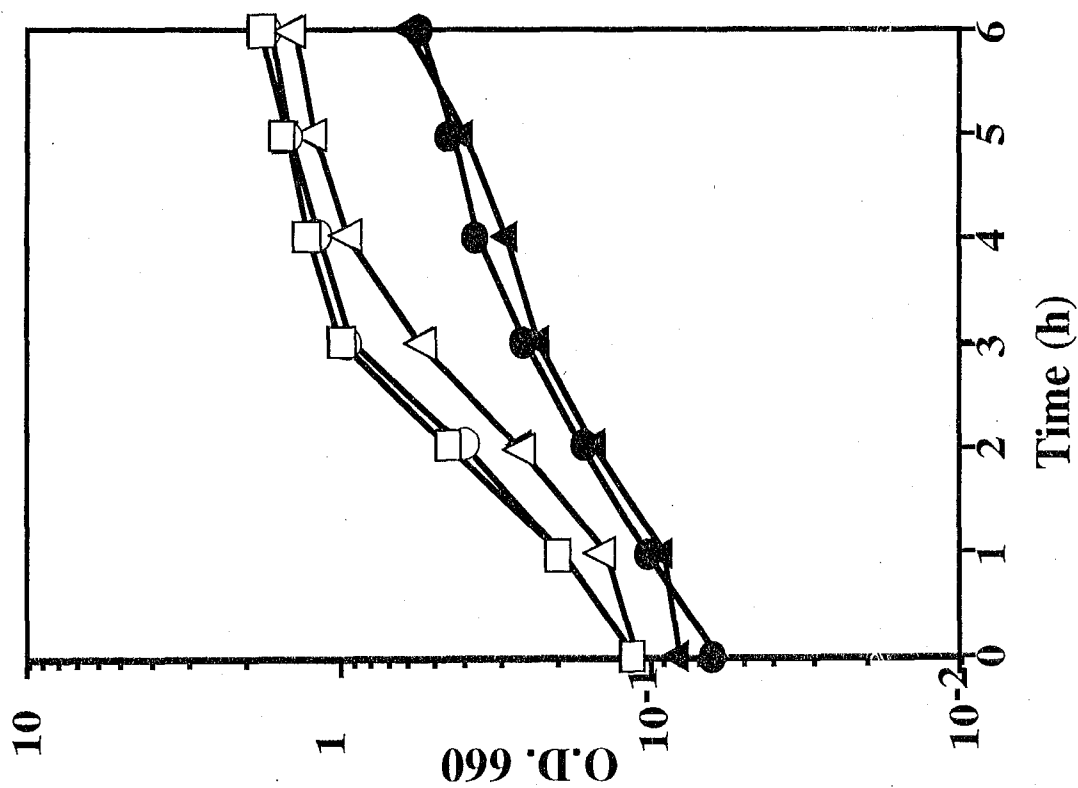


Fig. 2-3 Growth property of *E. coli* containing shuttle vector pC2 composed of pBL1 and pHSG298. Cells were grown in L broth at 30 °C.

Strain	Doubling time (min)
—□— JM109	52
—○— JM109/pHSG298	50
—●— JM109/pC2	75
—△— JM109/pDG12	57
—▲— JM109/pDG13	70

容易に導入でき、定常的に複製したが、生育阻害や細胞の伸長化は認められなかった。

○pBL1 における *E. coli* 細胞伸長に寄与する部位の特定

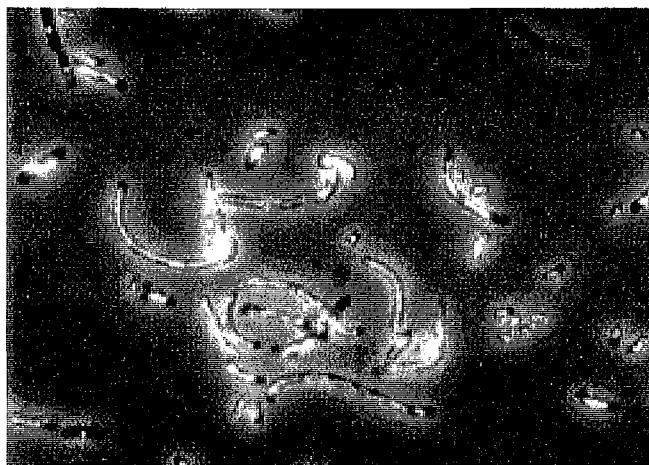
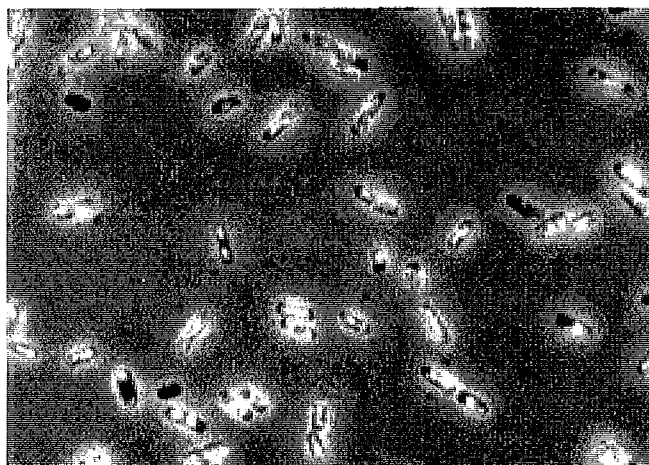
pC2 による *E. coli* 細胞に対する分裂阻害の原因を特定するため、シャトルベクター内の pBL1 に由来する断片が及ぼす影響を調べた。まず、各種欠失断片を構築し(Fig. 2-5)、それらの *E. coli* JM109 に対する影響を調べた。pBL1 の 2.39 kb の *Hind*III - *Xba*I 断片を持つ pDG1 では形態への影響は確認されなかった。一方 pBL1 の 2.06 kb の *Xba*I - *Hind*III 断片を含む pDG2 では生育阻害と著しい細胞の伸長化が認められた(Fig. 2-4、Fig. 2-5)。そこで、さらに pDG2 を基に欠失断片を作成し解析を行った(Fig. 2-5)。pDG3、pDG4、pDG6 および pDG8 は形態変化は起こさなかった。しかし pDG5 および pDG7(Fig. 2-4)は正常な細胞分裂を阻害した。これらの結果から pDG5 および pDG7 に含まれる 1.23 kb の *Acc*I - *Hind*III 断片が生育阻害および細胞伸長化に寄与していると結論した(Fig. 2-5)。

○塩基配列の決定と *in vitro* タンパク質合成実験

大腸菌の生育阻害や細胞の伸長化に影響を及ぼすと思われる 1.23 kb の *Acc*I - *Hind*III 断片の塩基配列を決定したところ、Filpula *et al.*, (1986)の結果に一致するものであった。この 726 bp の *Acc*I - *Hind*III 断片上にコードされる ORF を ORF3 と名付けた。決定した塩基配列の結果からこの ORF3 は 242 アミノ酸残基からなる 27890 Da のタンパク質をコードする事が予想された。*E. coli* の *in vitro* タンパク質合成系を用い、構築した各種プラスミドに由来するタンパク質を検討した。その結果、pC2 は 3 つのタンパク質と pHSG298 由来の kanamycin 耐性タンパク質(25 K)をコードしていた。pC2、pDG2 および pDG5 で合成された 28 K のタンパク質は、pDG1、pDG3、pDG4 および pDG6 では合成されなかった(Fig. 2-6)。これら前者の 3 種類のプラスミドは ORF3 を含んでいるのに対し、後者の 4 種類のプラスミドは完全もしくは部分的に ORF3 を欠失している。このことは、28 K のタンパク質が ORF3 に

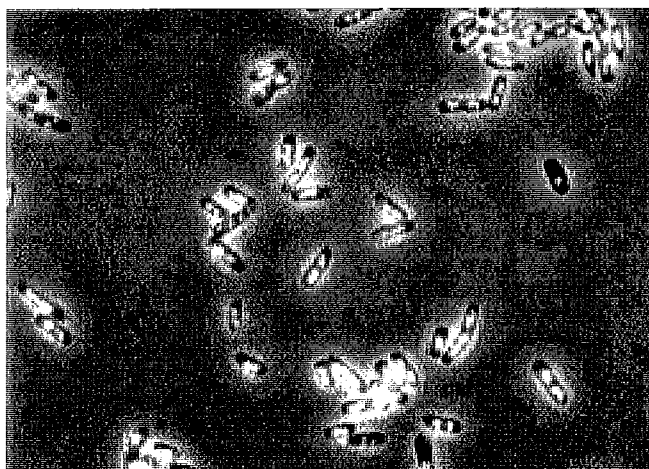
pHSG298

pC2



pDG1

pDG2



pDG11

pDG7

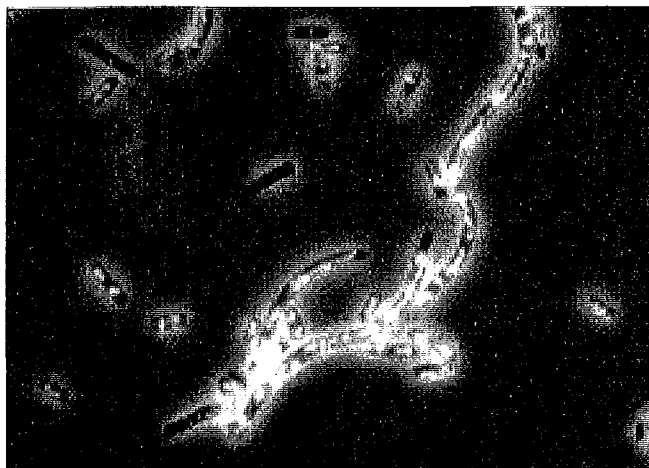


Fig. 2-4 Photomicrographs of *E. coli* JM109 containing pC2, its derivatives or pHSG298

Cells were grown in L broth at 30 °C till mid-log phase and photographed by fluo-phasecontrast microscopy.

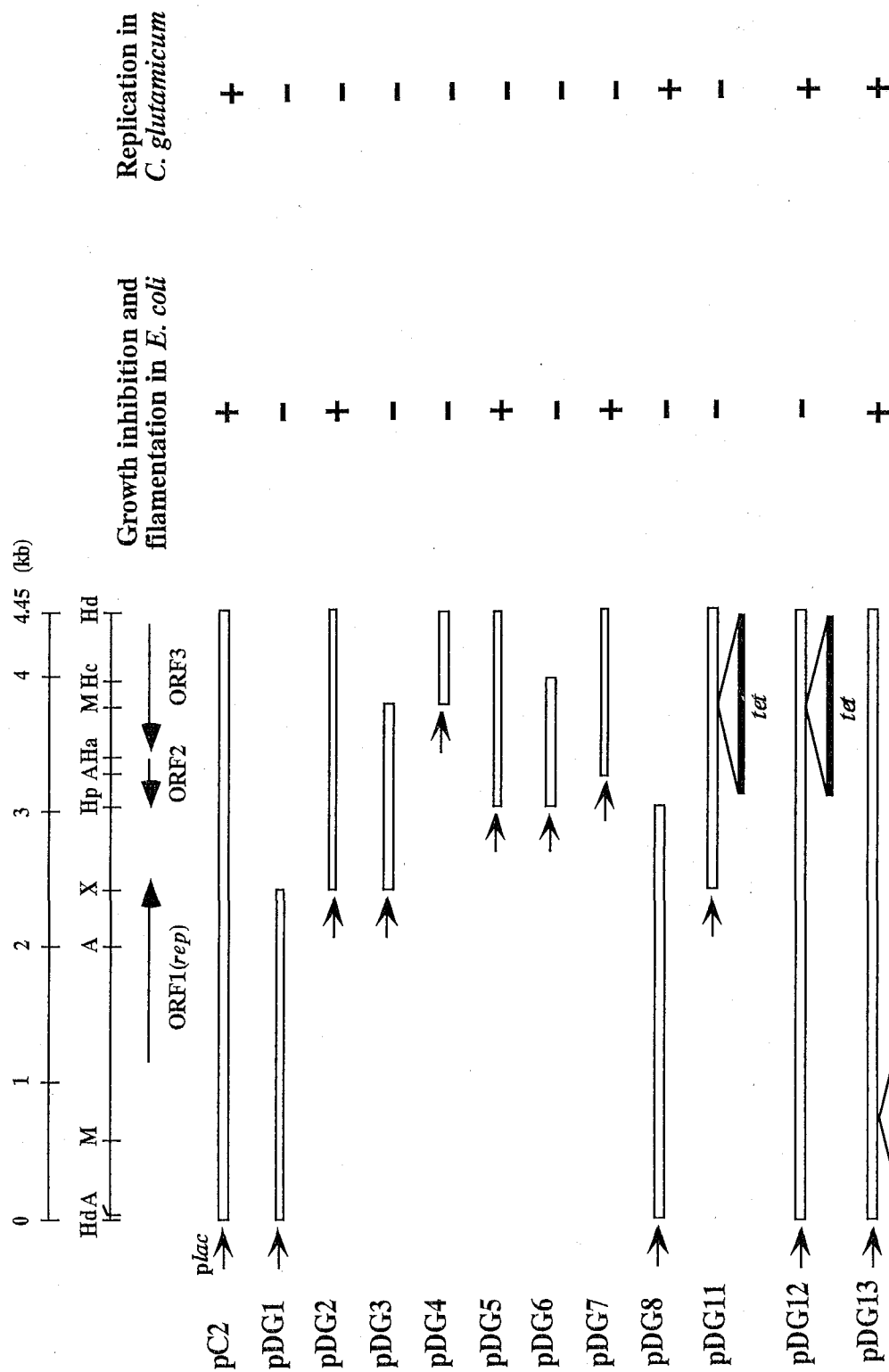


Fig. 2-5 Determination of a DNA fragment in pBL1 responsible for causing growth inhibition and cell filamentation in *E. coli*.

Several deletion plasmids from pC2 were constructed and their effects on *E. coli* JM109 and ability to transform *C. glutamicum* ATCC31831 were checked.

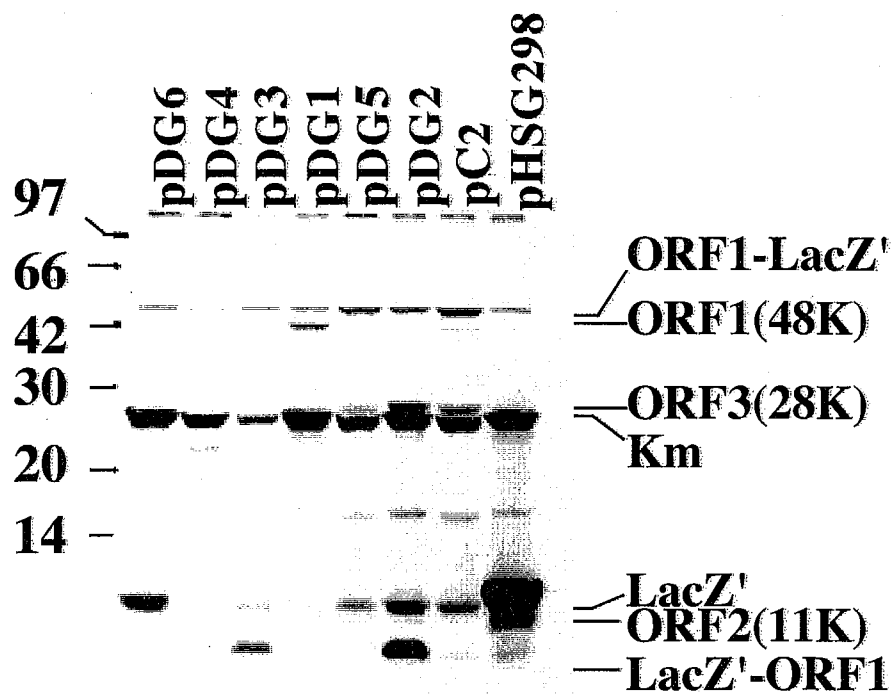


Fig. 2-6 Identification of gene products on pBL1.

In vitro protein synthesis assay with several deletion plasmids from pC2 were carried out using *E. coli in vitro* protein synthesis system.

コードされていることを示す。また、ORF3 とベクター上の *lac* プロモーターは逆向きであることから ORF3 は自己のプロモーターで発現していると考えられる。塩基配列のデータベース検索の結果 pBL1 は 1281 bp からなる ORF を含んでおり、427 アミノ酸残基からなる 47506 Da のタンパク質をコードしていると予想された。これを ORF1 とした。この点に関して、Filpula *et al.*, (1986) の見解と一致した。pDG1 は 48 K タンパク質由来と考えられるタンパク質が合成された。pDG1 では ORF1 の C 末端領域が欠失し *Xba*I サイトで *lacZ* 遺伝子とフレームが合致し ORF1-*lacZ*' 融合遺伝子を形成する。それに伴い、48 K タンパク質より大きい 449 アミノ酸残基からなる 50688 Da のタンパク質を合成したと考えられる。以上の結果は ORF1 が 48 K タンパク質を合成することを示す。次に、11 K のタンパク質が pC2、pDG2、pDG3、pDG5 および pDG6 によって合成された。しかし pDG1 および pDG4 では合成されなかった。この結果は 11 K のタンパク質が 0.74 Kb の *Hpa*I-*Mlu*I 断片に由来することを示すものである。またこの断片には 309 bp の ORF (ORF2) が含まれており、103 アミノ酸残基からなる 11819 Da のタンパク質をコードすることが予想された。pDG2 および pDG3 から 8 K のタンパク質が合成された。これは ORF1-*lacZ*' 融合遺伝子によるものと考えられる。

○ORF3 による生育阻害

ORF3 による阻害効果を明らかにするため、pDG2 上の ORF3 内の *Mlu*I サイトに tetracyclin 耐性遺伝子(*tet* gene cassett)を挿入した pDG11 を構築した。この pDG11 を保持する *E. coli* は正常な分裂と増殖を示した(Fig. 2-4、 Fig. 2-5)。次に ORF3 のコピー数による影響を調べるためローコピーベクター pMW119 およびハイコピーベクター pUC119 にクローニングし、それぞれ pDG9、pDG10 とした。これらのプラスミドは pC2 が持つ pHSG298 由来の kanamycin 耐性能とは異なる b-lactam 耐性能を持つ。ローコピーの pDG9 は *E. coli* に対し阻害効果は示さなかった。一方ハイコピーの pDG10 では pC2 同様の結果となった(data not shown)。この結果

から、ORF3 による生育阻害は遺伝子量によるもので薬剤耐性能に起因するものではないことが示唆された。

○コリネ型細菌における ORF3 の役割

*Mlu*I サイトに Tetracyclin 耐性遺伝子を挿入した pDG12 を構築した(Fig. 2-5)。pDG12 は *E. coli* に対する阻害効果は示さず、*C. glutamicum* ATCC31831 に容易に導入することができた(Fig. 2-5)。さらに 10 世代以上にわたり安定に保持された(Fig. 2-8)。次に、pC2 より、ORF2 および ORF3 を含む *Hpa*I - *Hind*III 断片を除去し、ORF1 を唯一の ORF とした pDG8 を構築した(Fig. 2-5)。このプラスミドもまた *E. coli* に対する阻害効果は示さず、*C. glutamicum* ATCC31831 に容易に導入でき、プラスミドの安定性において pDG12 同様の結果を示した。これらの結果はコリネ型細菌において、pBL1 の安定維持には ORF1 のみが重要な役割を果たし、ORF2 および ORF3 は不要であることを示している。

考察

本章において、*E. coli* の細胞複製に対するコリネ型細菌由来のプラスミド pC2 の影響を解析した。*Shigella dysenteriae* における 4 kb の congo-red binding plasmid (pCAT120)が *E. coli* K12 に対し同様の効果を示すことを Biswas *et al.*, (1992)が報告している。コリネ型細菌由来の pBL1 と大腸菌ベクター pHSG298 からなるシャトルベクター pC2 は *E. coli* JM109 に対し極度の生育阻害と細胞分裂および染色体の分配に致命的な影響を及ぼしていた。各種欠失プラスミドの解析および *in vitro* assay の結果から 28 K のタンパク質をコードしている 726 bp の ORF3 が正常な細胞分裂を阻害していることを見いだした。*E. coli* JM109 は *recA*-なので ORF3 による SOS 応答の誘導は考えられない。*E. coli* JM109/pC2 は L plate 上でムコイド状のコロニーを形成した。*E. coli* における *lon* 変異株でも同様のムコイド状のコロニーを形成することが知られている。このことから、この 28 K は大腸菌の細胞内のタンパク質代謝を阻害することが示唆された。しかしながら、その詳細については今

後の研究に期待したい。*in vitro* タンパク質合成実験において pBL1 断片上の主な 3 つの ORF である ORF1、ORF3 および ORF2 からそれぞれ 48 K、28 K および 11 K のタンパク質が合成されることを確認した。

欠失プラスミド(pDG1 - pDG7)は *C. glutamicum* ATCC31831 内での複製能を失っているが、ORF2 および ORF3 を欠失し ORF1 を含んだ pDG8 は容易に *C. glutamicum* ATCC31831 に導入できさらに 10 世代以上にわたり安定に保持した。これは ORF1 がコリネ型細菌におけるプラスミドの安定維持に関与するが、他の ORF は関与しないことを示唆している。また、コリネ型細菌において、プラスミドの安定性に関し、ORF1 の重要性が報告されている(Yamaguchi *et al.*, 1985、Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1994)。ORF1 の塩基配列から予想されるアミノ酸配列(427 アミノ酸残基)は *Streptomyces lividans* 由来の pIJ101 における自己複製に関与する 450 アミノ酸残基からなる *rep* タンパク質(Kendall *et al.*, 1988)と高い相同性を示した(Fig. 2-7)。そこで、この ORF1 を pBL1 における *rep* タンパク質と結論した。コリネ型細菌において ORF2 のプラスミドの安定性への影響は認められなかった。また ORF2 および ORF3 の両 ORF を除去してもその影響は認められず、少なくともプラスミドの安定性には不要と考えられる(Fig. 2-8)。ORF3 は GenBank のデータベース検索においても相同性を示す物がなく未知のタンパク質であった。また、コリネ型細菌におけるこのタンパク質の役割は不明である。これらの ORF を除去し ORF1 のみを有する pDG8 (Fig. 2-9)は *E. coli* において生育阻害や形態変化を起こさなかった。これらのことから pDG8 は有用性の高いシャトルベクターと考えられる。

The ORF1 protein (427 amino acid residues) has high homology with the *rep* protein (450 amino acid residues) of plasmid pIJ101 from *Streptomyces lividans* (Kendall et al., 1988) which is capable of autonomous replication.

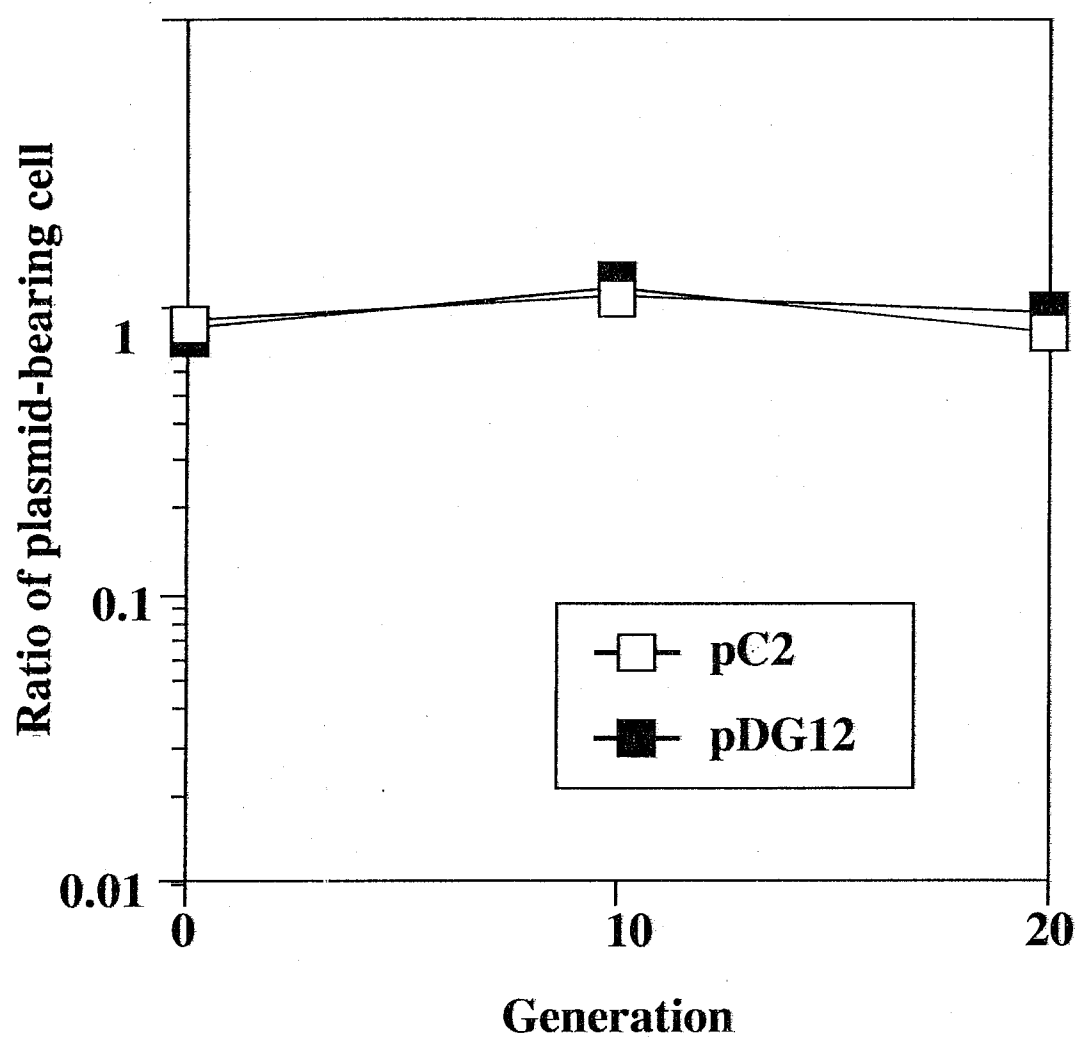


Fig. 2-8 Plasmid stability of pC2 and pDG12 in *C. glutamicum* ATCC31831.
Stability was determined by the ratio of colony numbers in the presence and absence of kanamycin.

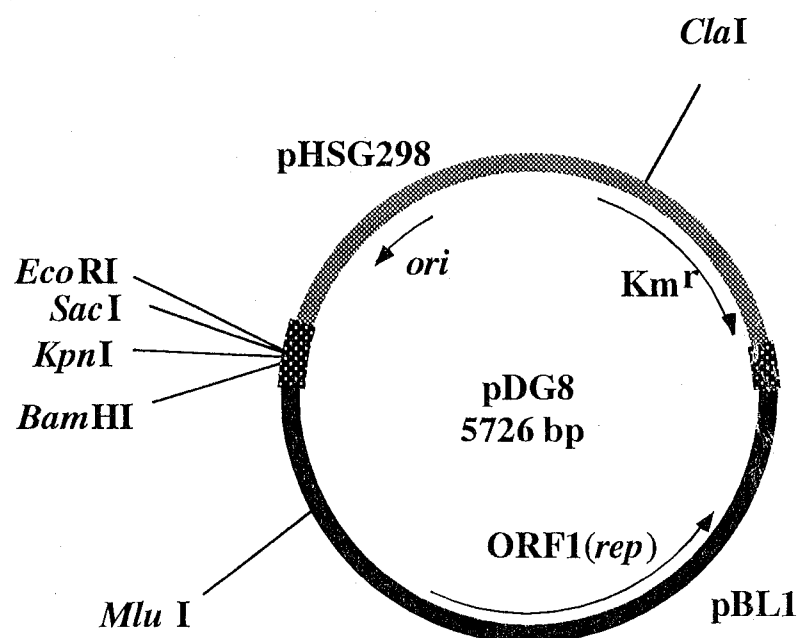


Fig. 2-9 Structure of pDG8.

要約

コリネ型細菌の一種である *Brevibacterium lactofermentum* ATCC21798 より抽出した潜在プラスミド pBL1 と *Escherichia coli* のベクター pHSG298 からなるシャトルベクター pC2 による *E. coli* の生育阻害と細胞の著しい伸長化を見いだした。各種制限酵素による欠失断片を構築し、解析を行った結果 1.23 kb の *AccI* - *HindIII* 断片がこれらの現象を引き起こすことが判明した。この断片の塩基配列の決定と過去のデータベース検索により、pBL1 内には 3 つの ORF が存在していた。このうち生育阻害と細胞の伸長化に関与するのは 242 アミノ酸残基をコードした 726 bp の ORF3 であることを見いだした。*in vitro* タンパク合成を行った結果 ORF3 には、28 K のタンパク質がコードされており、塩基配列より予想されるタンパク質の分子量に一致した。3 つの ORF のうちコリネ型細菌細胞内でのプラスミドの複製に関与するのは 1281 bp の ORF1 だけであった。データベースの検索の結果 ORF1 は *Streptomyces lividans* 由来のプラスミド pIJ101 の *rep* タンパク質と高い相同性があった。これらの知見を基に、ORF2 および ORF3 を除去した pDG8 を構築し、コリネ型細菌の細胞内における安定性を検証した結果 pC2 と同等であることが判かり、シャトルベクターとしての有用性の高さを確認した。

コリネ型細菌の細胞分裂様式の解析

はじめに

コリネ型細菌はグラム陽性の孢子形成能を持たない桿菌で自然界に広く分布している。近縁種として *Mycobacterium*、*Nocardia*、*Rhodococcus* がある。*Corynebacterium glutamicum* に代表される非病原性のコリネ型細菌はグルタミン酸 (Kinoshita *et al.*, 1957b)、アスパラギン酸 (Shiio *et al.*, 1982) 等の各種アミノ酸生産に用いられる有用な細菌である。*Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸を生産する菌として分離された (Kinoshita *et al.*, 1957)。グルタミン酸の生産性向上として、biotin 制限 (Shiio *et al.*, 1962)、penicillin 添加 (Nunheimer *et al.*, 1970)、界面活性剤添加 (Takinami *et al.*, 1965) 等の方法が開発されてきた。これらの各処理方法は細胞壁や膜に影響を及ぼすことで生育阻害を引き起こす事が知られている。そこで本研究では、その第一歩としてグルタミン酸生産と生育阻害の関係を明らかにすることを目的とした。コリネ型細菌の細胞は生育の過程でしばしば、V字型を示す。これは本細菌特有のスナッピングと呼ばれる (Fig. 1-1) 細胞分裂様式に起因するものである。本菌は2層からなる厚い細胞壁を有している。内側の層は主に Peptidoglycan から成り、隔壁形成を司る。また外側の層は主にミコール酸から成るもので、細胞分裂のあとに分離する。そのため分裂後に本菌特有の挙動が生じる。

本章においては、コリネ型細菌における細胞分裂機構の解明の第一歩として、温度感受性細胞分裂変異株の分離とその解析ならびに細胞分裂阻害剤による *C. glutamicum* ATCC31831 の生育と形態に及ぼす影響について調べた。

材料と方法

○供試菌株および生育条件

Corynebacterium glutamicum ATCC31831 (野生株)、*Escherichia coli* K-12 strain CSH26 [F⁻ *ara* Δ(*lac-pro*) *thi*] (Miller *et al.*, 1972) を用いた。両菌株は Lennox (L) broth (Lennox *et al.*, 1955) または 1.5 % agar を含んだ L plate で培養した。L broth での生育の変化は 660 nm における吸光度で確認した。コリネ型細菌は細胞が凝集する傾向があるので超音波処理 (30 sec.) 後フローサイトメトリーによる粒子数の測定を行う

た(FACS Calbur, Becton Dickinson Immunocytometry System, USA)。

○*C. glutamicum* への変異処理

Corynebacterium glutamicum ATCC31831(野生株) の細胞 10^9 cells に対し、生理食塩水中で 1 時間 NTG (300 mg/ml)処理をした。実験によるが約 10 - 20 %の生存率であった。変異処理した細胞を L plate 上に 10^3 - 10^4 の割合で塗布し、30 °C で 24 h 培養した。生育したコロニーをレプリカ法にて 30 °C 、37 °C で 48 h 培養した。このうち 37 °C では生育せずに 30 °C で生育したものを L plate 上で培養し純化した。得られたクローンの希釈系列を作成し、L plate 上で培養し 30 °C および 37 °C におけるコロニー形成効率が 10^4 以上の違いがあるものを温度感受性変異株とした。約 100000 のコロニーから 150 株の温度感受性変異株を得た。

○顕微鏡観察

第二章の方法に従った。

○試薬

cephalexin (CEX)、chloramphenicol (CP)は Sigma 社製を使用した。sparfloxacin (SPFX)は大日本製薬株式会社から分与されたものを、また他の試薬は特級試薬を用いた。

結果

○温度感受性細胞分裂変異株の分離

コリネ型細菌における細胞分裂機構の解明のための第一歩として、制限温度条件において細胞形態を伸長させる *E. coli* の *fts* 変異株と類似した変異株の取得を試みた。野生株 *Corynebacterium glutamicum* ATCC31831 は 20 °C、30 °C および 37 °C では生育できるが 42 °C では生育できない。また 20 °C では生育遅延が認められる。野生株の場合これらの異なる生育条件においても形態に変化は生じない。この

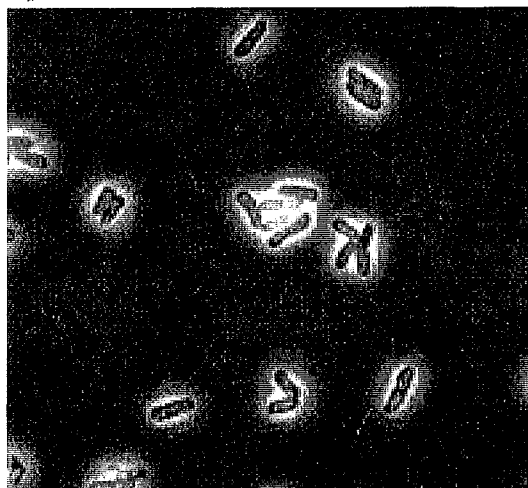
野生株に上述の変異処理を施し、37℃で温度感受性を示す変異株を分離した。得られた *C. glutamicum* の温度感受性変異株を平賀らの方法に従い観察した。その結果 30℃では野生株と同様であった。一方制限温度条件である 37℃では多くの細胞が僅かな伸長化または末端部分が膨らんだダンベル状の形態を示した(Fig.3-1)。しかしながら *E. coli* の *fts* 変異株に見られる極端に伸長した細胞形態は認められなかった。ごく一部の変異株ではあるが、その形態が全体が膨張したものもしくは球形を示したものもあった。

○Peptidoglycan (隔壁)合成阻害剤 CEX の *C. glutamicum* における生育および形態への影響

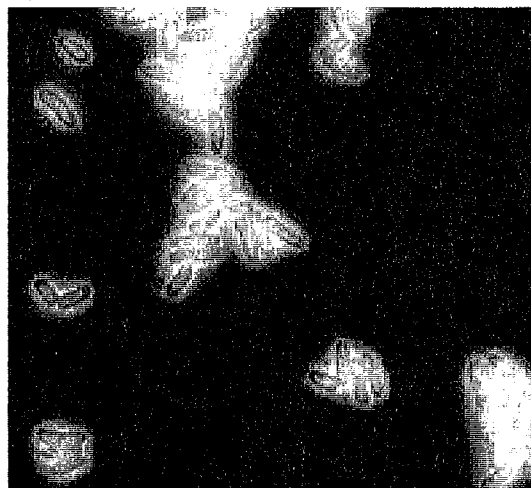
上記の結果は予想に反するものであった。また、*E. coli* と比較し特異なものであった。*E. coli* の場合、温度感受性細胞分裂変異株のうち、約 30 - 70 %が制限温度条件で伸長した細胞形態を示す(data not shown)。そこでコリネ型細菌は細胞分裂の阻害が細胞の極端な伸長に至らない特徴的な機構があることが考えられる。

CEX は *E. coli* において隔壁部分の Peptidoglycan 合成を司る PBP-3 (*ftsI* 遺伝子にコードされているタンパク質)の活性を阻害することが知られている(Spratt *et al.*, 1975)。このため、培養中の *E. coli* に CEX を添加すると、その細胞形態は制限温度下における *ftsI* 変異株同様の伸長したもとなる。*C. glutamicum* も *E. coli* 同様 CEX に対し感受性を示す。*C. glutamicum* の場合 CEX の MIC (最小阻害濃度)は 1 mg/ml であり、*E. coli* CSH26 では 5 µg/ml であった。MIC の 5 倍濃度に相当する 25 mg/ml 処理で *E. coli* 細胞の伸長化が誘導された(Fig.3-2)。伸長化を示した細胞には多数の核様体も確認された。CEX 添加に伴う培養液の濁度の変化は対照区と同様であり、cell mass の増加が認められた。これより細胞分裂の阻害後も細胞の伸長は止まらず、それ以前と同じ割合で増殖したことがわかる。一方、*C. glutamicum* に

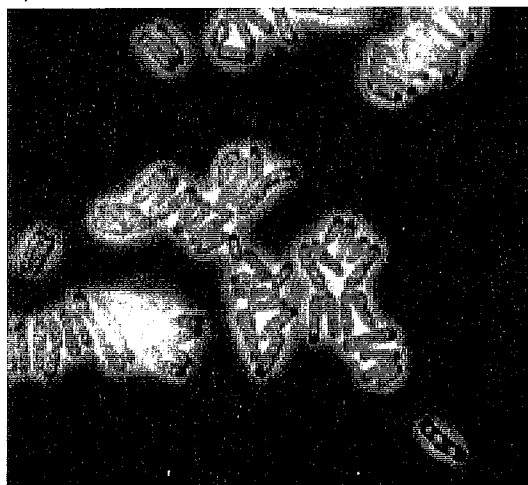
a) Wild 30 °C



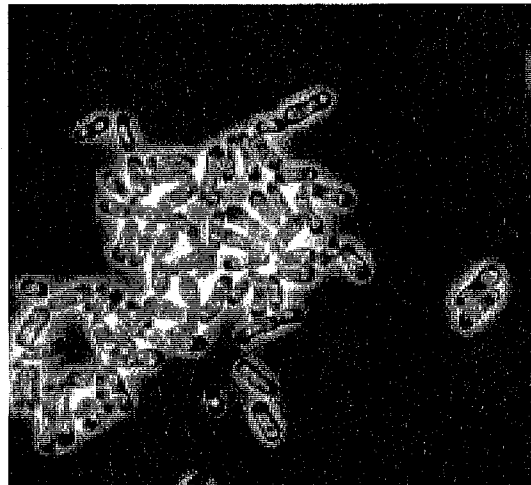
b) Wild 37 °C



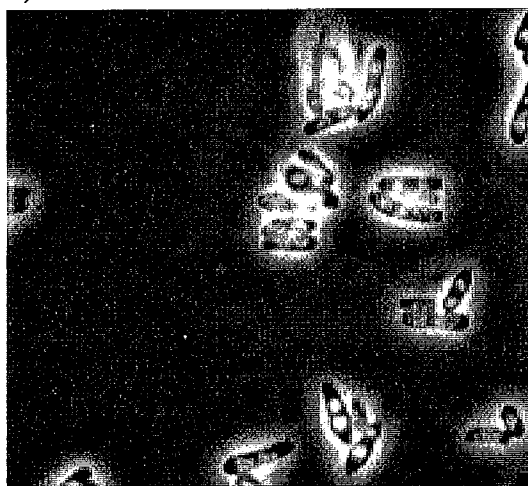
c) Mutant #1 30 °C



d) Mutant #1 37 °C



e) Mutant #2 37 °C



d) Mutant #3 37 °C



Fig. 3-1 Photomicrographs of DAPI stained *C. glutamicum* ATCC31831 and *C. glutamicum* mutants

Cells were grown in L broth at 30 °C till mid-log phase and photographed by fluo-phasecontrast microscopy.

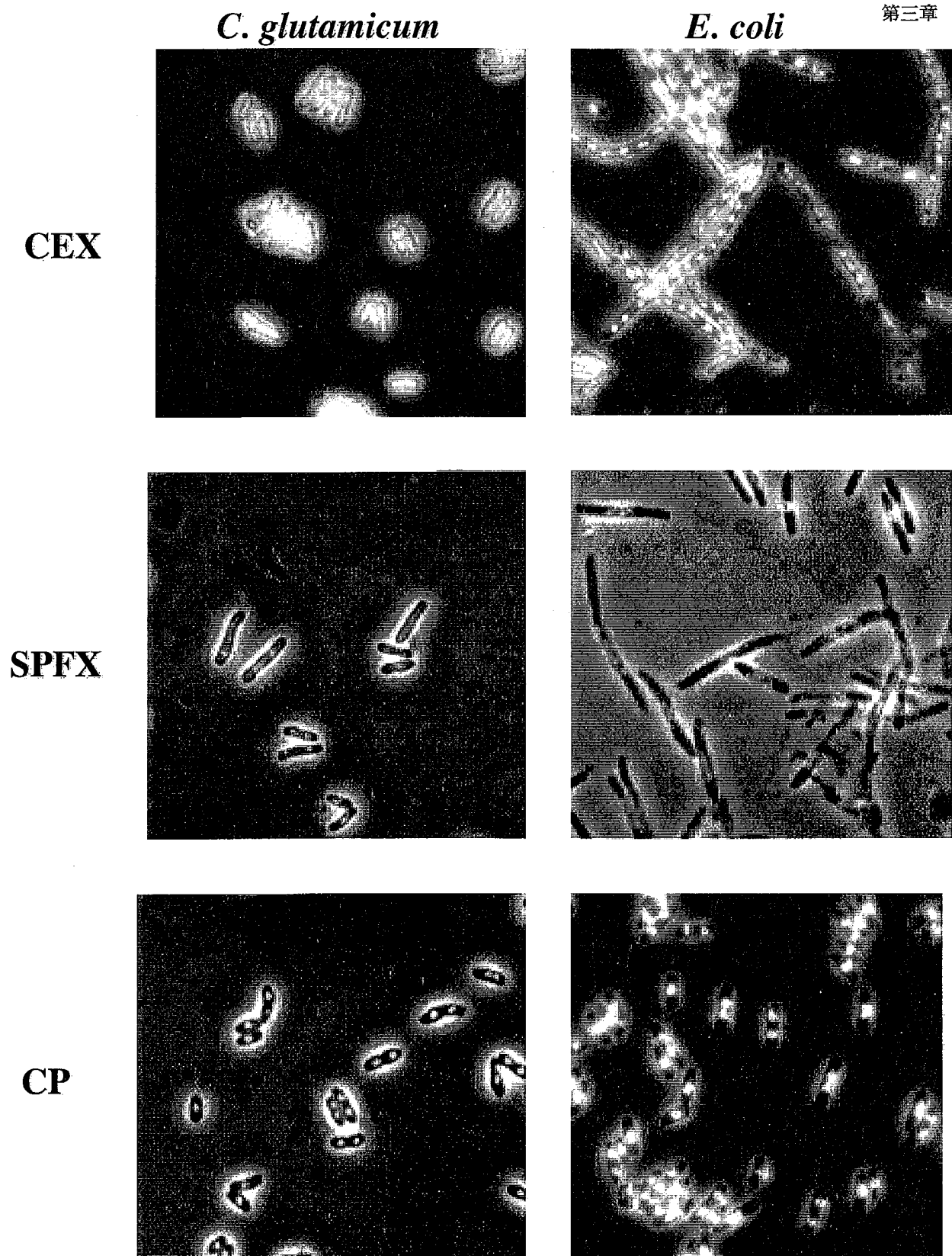


Fig. 3.-2 Different effects of cell division inhibitors on *C. glutamicum* and *E. coli* cell morphology.

Exponentially growing cultures in L broth at 30 °C were treated with indicated antibiotics at OD₆₆₀ = about 0.1 and after 2 hr cell morphology was examined as described in Materials and Methods. *C. glutamicum* ATCC13831 and *E. coli* CSH26 were treated with 5 x MIC of cephalexin (CEX), 10 x MIC of sparfloxacin (SPFX), or 10 x MIC of chloramphenicol (CP).

MIC の 5 倍濃度に相当する 5 $\mu\text{g/ml}$ の CEX を添加した場合細胞の伸長は認められなかった。そのかわりに若干の伸長が認められ、前述の温度感受性細胞分裂変異株ときわめて類似性の高い形態を示した。培養液の濁度は阻害剤添加後約 2 倍に増加した(Fig.3-2A)。またこの時の培養液中の粒子数には変化がなかった(Fig.3-3C)ので濁度上昇はわずかな細胞伸長または膨張によるものと考えられる。この結果はフローサイトメトリーによっても確認された(Fig.3-3D)。各種濃度(1 x MIC - 20 x MIC)における CEX の *C. glutamicum* への影響は同様であった。この結果は *C. glutamicum* が細胞分裂が止まると細胞の伸長化も止まるとする仮説を裏付けるものである。タンパク質合成阻害剤である chloramphenicol (CP)の添加直後、供試した 2 菌株は直ちに生育を止めた(Fig.3-3A)。またこの時の両菌株の形態は正常の長さを持つ桿状で、1 または 2 個の核様体も確認された(Fig.3-2)。

○DNA 合成阻害剤による *C. glutamicum* の生育および形態への影響

薬剤や変異による *E. coli* における DNA 合成阻害は細胞を伸長させることが知られている。DNA 合成阻害剤による直接的な影響は染色体の複製に対してであるが、間接的な影響としては SOS 応答の誘導がある。DNA 合成が阻害された細胞は SOS 応答を介して細胞分裂が停止するが、増殖は停止しないため細胞が伸長する。sparfloxacin (SPFX)は新規のキノロン剤であり、DNA gyrase の活性を阻害し DNA 複製を止める(Lewin *et al.*, 1992)。本薬剤の MIC は *C. glutamicum* では 0.25 $\mu\text{g/ml}$ であり、*E. coli* では 0.03 mg/ml であった。*E. coli* CSH26 に SPFX を MIC の 10 倍量に相当する 0.3 mg/ml 添加した場合、細胞形態は伸長を示した (Fig.3-2)。また、細胞内に不均一な核様体が確認された。(Fig.3-2)培養液の濁度は薬剤添加後も上昇し続けた。一方 *C. glutamicum* ではわずかな細胞伸長が MIC の 10 倍量に相当する 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の SPFX によって起こった。培養液の濁度は、薬剤添加後約 3 倍まで上昇した後に停止した。同じく DNA 合成を阻害する mitomycin C も同様の影響を示した(data not shown)。これらの結果は DNA 合成阻害剤による間接的な細胞分裂阻害も細胞の伸長を停止させることを意味する。

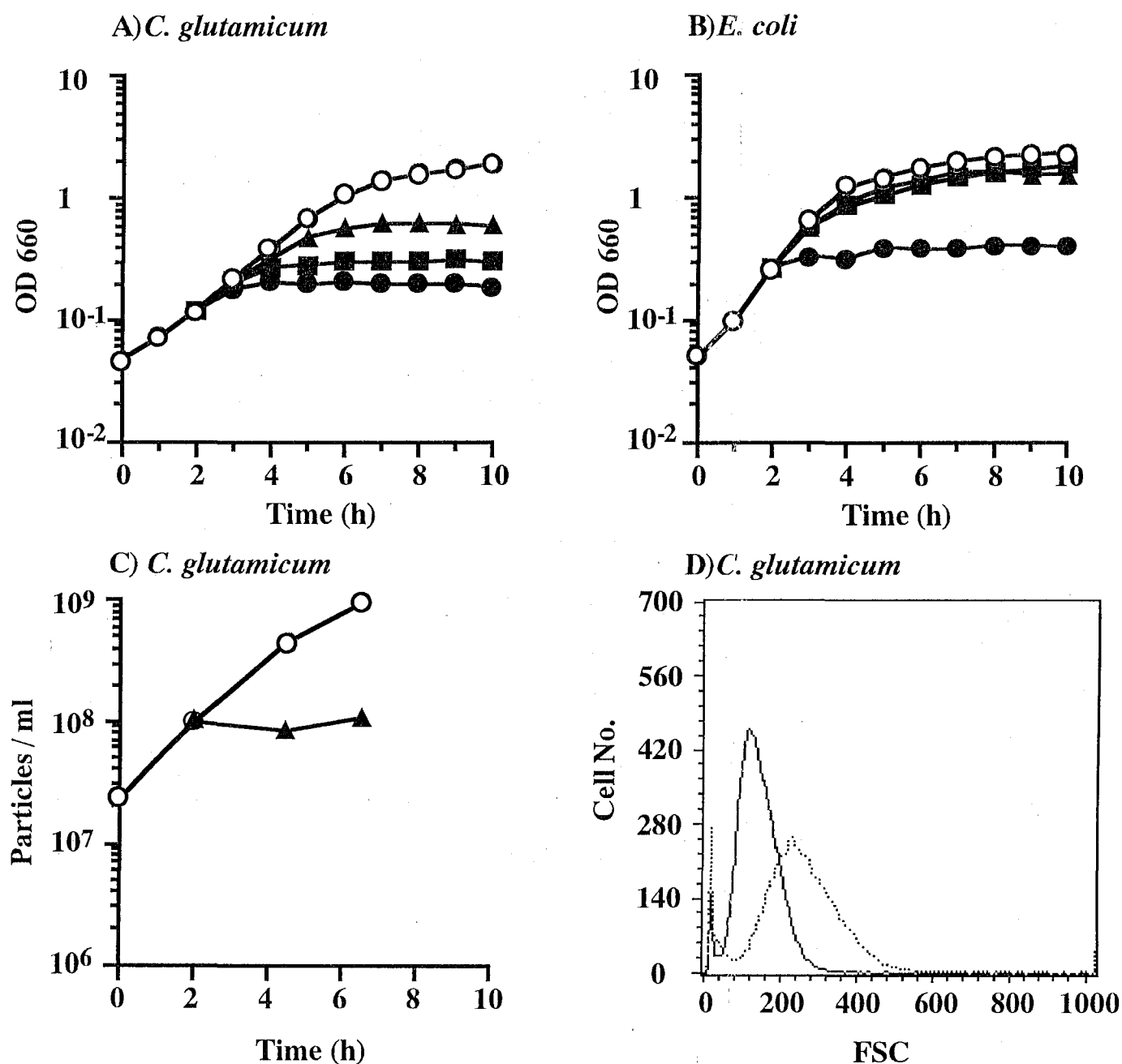


Fig. 3-3. Different effects of cell division inhibitors on *C. glutamicum* and *E. coli* cell growth.

Cell growth (OD660), particle number and cell mass (forward scatter; FSC) were monitored as described in Materials and Methods. In A (*C. glutamicum*) and B (*E. coli*), 5 x MIC of cephalexin (closed triangles), 10 x MIC of sparfloxacin (closed squares), and 10 x MIC of chloramphenicol (closed circles) were added to the exponentially growing cultures in L broth at 30 °C at time 2 hr. Control is represented by open circles. A) OD660 of *C. glutamicum* ATCC31831, B) OD660 of *E. coli* CSH26, C) particle number of *C. glutamicum* (control; open circles and cephalexin; closed triangles), D) cell mass of *C. glutamicum*. Cell mass was measured at time 6.5 hr with control culture (continuous line) and cephalexin treated culture (dotted line).

考察

E. coli や *Bacillus subtilis* のような桿菌は抗生物質や変異による隔壁合成阻害により直接的な細胞分裂阻害を受けると、通常著しく伸長した形態を示す。また DNA 合成阻害剤による間接的な影響によっても同様の形態変化が引き起こされる。本章において、第一目標とした *C. glutamicum* ATCC31831 からの制限温度で顕著に伸長する変異株の分離は失敗に終わった。しかしその一方で、*C. glutamicum* では薬剤や変異による細胞分裂の阻害が極端な細胞伸長を引き起こすのではなく、正常細胞の約 2 倍を最大とする僅かな伸長しか導かないことを見いだした。この結果は細胞分裂の停止が細胞増殖の制御に関わっていることを示唆するものと考えられる。さらに、コリネ型細菌は分裂後にスナッピングと呼ばれる独特な分裂様式を持っている。これらの細菌群は厚い 2 層からなる細胞壁を有している。内側の層は Peptidoglycan による隔壁形成を行い、外側の層はその後に裂けるように分離する。その結果として、分裂後の独特な細胞の挙動が起こり、また同時に外層が分離していない細胞は集合体を形成する。そのためコリネ型細菌における成熟した母細胞の 2 分裂は新しい 2 つの娘細胞の誕生とは同義ではない。外層の分離なしには 2 つの娘細胞の誕生は起こらないからである。抗生物質や変異による隔壁形成が阻害されると外層の分離も停止すると考えられる。おそらく、外層の完全な分離は次の細胞分裂を開始するために予め必要なことと思われる。

C. glutamicum はグルタミン酸の工業生産に広く利用されている有用性の高い細菌である。しかしながら *C. glutamicum* は通常の条件ではグルタミン酸を細胞外には蓄積しない。この現象は biotin 欠乏条件下、penicillin 存在下、界面活性剤存在下といった特殊な条件でのみ起こることである。生産に利用される菌株の育種もこれらの物質に対し感受性を高めることをその目標としてきた。penicillin は Peptidoglycan 合成を阻害し、また biotin や界面活性剤は脂質の合成や代謝にそれぞれ影響を与えられとされる。これらの処理は全て *C. glutamicum* の生育に阻害を引き起こす。しかし、興味深いことに溶菌は起こらなかった(data not shown)。これらの現象も前述の独特な細胞分裂機構に起因すると考えられる。最後にこの章によ

り得られた知見を模式的に示す(Fig. 2-4)。

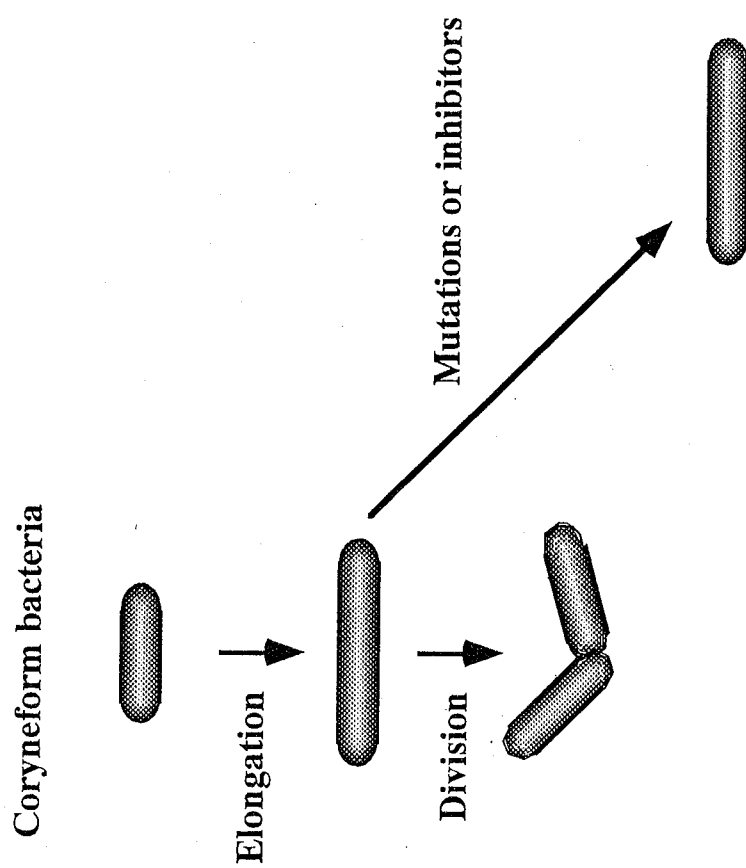


Fig. 3-4 Hypothetical model of the division fashion in coryneform bacteria.

要約

コリネ型細菌における細胞分裂機構の解明のために、NTG による変異処理をした *Corynebacterium glutamicum* ATCC31831 からの温度感受性細胞分裂変異株の分離を試みた。またこの際、*Escherichia coli* における *fts* 変異株のように伸長化した細胞形態を示す変異株の分離を第一目標として行った。しかしながら、得られた変異株は制限温度である 37°C において、膨潤したダンベル状もしくは僅かに伸長した細胞形態のみを示した。次に、細胞分裂阻害剤による影響を調べた。*E. coli* では cephalexin や sparfloxacin がそれぞれ隔壁形成や DNA 合成を阻害し、細胞を極めて伸長させることが知られている。しかし、*C. glutamicum* ではこれらの両薬剤によって形態的变化は起こったものの、伸長化は認められなかった。この薬剤による形態変化は分離した変異株の形態に類似したものであった。これらの結果は *C. glutamicum* は細胞分裂の抑止が細胞の成長の停止を促す特異な制御機構を持つことを示唆するものである。

コリネ型細菌における Penicillin-Binding Proteins (PBPs) とグルタミン酸生産の関係

はじめに

Corynebacterium glutamicum、*Brevibacterium lactofermentum* *Brevibacterium flavum* をはじめとするコリネ型細菌は、各種アミノ酸生産に用いられている極めて有用な細菌である。本細菌には penicillin を投与することで著量のグルタミン酸を生産する penicillin 効果が知られている(Nunheimer *et al.*, 1970)。一方、penicillin は細胞壁の成分 Peptidoglycan の合成を司る Penicillin-Binding Proteins (PBPs)に結合しその活性を阻害する(Spratt *et al.*, 1975)。その結果、*E. coli* 細胞の溶菌化を促す。しかしながら、コリネ型細菌においては、増殖は押さえるが溶菌せずに(Fig. 1-2)、さらに一次代謝産物であるグルタミン酸を細胞外に蓄積する。コリネ型細菌によるグルタミン酸の生産性向上のための研究の一端として、細胞壁合成阻害剤である penicillin の添加や脂肪酸合成系に影響を及ぼす Biotin (Shiio *et al.*, 1962)の制限が発見された。後者については、そのターゲットとなる遺伝子のクローニングがなされて(Kimura *et al.*, 1996)その解析が進められているが、前者の penicillin による効果に関しては解明されていない。そこで本章においては penicillin のターゲットである PBPs の検出及びその解析とグルタミン酸生産との関係について解析した。

材料および方法

○供試菌株および培養条件

Corynebacterium glutamicum ATCC31831、*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869、*Brevibacterium ammoniagenes* ATCC6892、*Brevibacterium acetylicum* ATCC953 を Penicillin-Binding Proteins (PBPs)の分離に用いた。細胞は Lennox (L) Broth (Lennox *et al.*, 1955)中で 30 °C 通気条件下で培養した。必要に応じ、penicillin G (PC G)、mecillinam (MPC)および cephalexin (CEX)を加えて培養した。

○PBP assay

各細胞は濁度(OD 660nm)が 1 程度に達するまで培養し、氷水中にて急冷後集菌した。集菌した細胞を燐酸緩衝液(Na-P 50 mM, pH 7.0)に懸濁し菌体重と同量

の glass beads と共に超音波破碎し遠心した上清をさらに超遠心(100000 X g、30 min.)した沈殿を膜画分とした。この膜画分を Pierce 社製タンパク質定量キットを用い定量し、4-7 mg/ml に調製した。PBPs の検出は ^{14}C -penicillin G との結合能により行った。調製した膜画分と ^{14}C -penicillin G を反応しそれを SDS-PAGE(10 % gel)により分離し、その放射活性を測定した。詳細は(Spratt 1975)、(Tamaki *et al.*, 1977)に従った。

○グルタミン酸の定量

グルタミン酸の定量はグルタミン酸オキシダーゼを用いた酵素膜電極(旭化成社製、バイオテックアナライザーAS-210)を使用して行った。

○試薬

PBP assay に用いた ^{14}C -penicillin G は ^{14}C -benzylpenicillin (N-ethylpiperidium salt, 65.2 mCi/mg, dissolved in acetone) (Amersham LIFE SCIENCE)を用いた。その他の薬剤は全て特級試薬を用いた。

結果

○PBP の検出およびその解析

供試した 4 菌株のうち、グルタミン酸生産能を持つ *C. glutamicum* ATCC31831、*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 からは 110 kDa、100kDa、60kDa の 3 種類の Penicillin-Binding Proteins PBPs が検出された(Fig. 4-1)。バリン生産能を持つ *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC6892 からは 110 kDa、100 kDa、70 kDa の 3 種類の PBPs がまたアミノ酸生産能を持たない *Brevibacterium acetylicum* ATCC953 からは 110 kDa、65 kDa、2 の種類の PBPs が検出された(Fig. 4-1)。このうち、*C. glutamicum* ATCC31831 から検出された PBPs を分子量の大きい順に PBP-1、PBP-2、PBP-3 として、以下の実験に用いた。

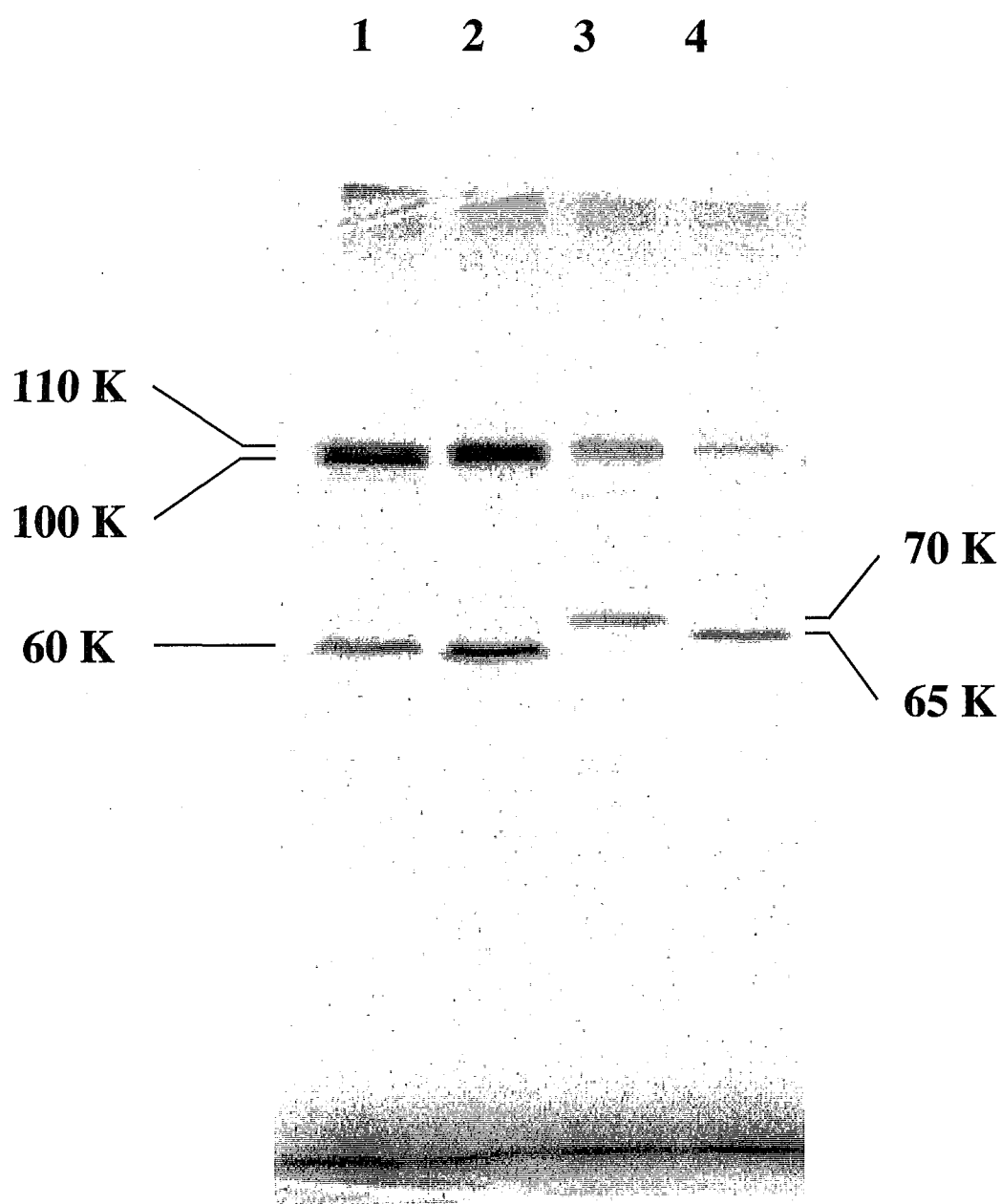


Fig. 4-1 Detection of Penicillin-Binding Proteins in several coryneform bacteria.

Penicillin-Binding Proteins (PBPs) were detected by the procedure of binding ^{14}C -penicillin G. Membrane fractions were prepared from *Corynebacterium glutamicum* ATCC31831 (Lane 1), *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 (Lane 2), *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6892 (Lane 3) and *Brevibacterium acetylicum* ATCC953 (Lane 4).

penicillin G (PC G)の誘導体である mecillinam (MPC)、cephalexin (CEX)との親和性を調べた。*E. coli*における PC G の効果は Peptidoglycan の合成阻害である。その誘導体である MPC、CEX にも合成阻害効果があるがそれぞれ長軸方向と隔壁部分の Peptidoglycan の合成を特異的に阻害する。そのため両薬剤との親和性を調べることは PBPs の特性を把握する上で重要である。*C. glutamicum* ATCC31831 より調製した膜画分と PC G、MPC、CEX のそれぞれとの親和性を ^{14}C -PC G を用い PBP assay (Spratt *et al.*, 1975)にて調べた。PC G については直接 ^{14}C -PC G との結合能を MPC、CEX については $0.01\ \mu\text{M}$ 、 $0.1\ \mu\text{M}$ 、 $1\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}$ の MPC または CEX を加えた後に ^{14}C -PC G を加え、 ^{14}C PC G との結合能を測定した。その結果、PC G は $0.1\ \mu\text{M}$ で PBP-2 とまた、 $1\ \mu\text{M}$ で PBP-1 および PBP-3 と結合能を示し、PBP-2 との最も高い親和性が確認された(Fig. 4-2、Fig. 4-3)。MPC は $100\ \mu\text{M}$ で PBP-3 と結合能を示し最も高い親和性が確認された。PBP-1 および PBP-2 とはほとんど結合能は認められなかった (Fig. 4-4、Fig. 4-5)。CEX では $1\ \mu\text{M}$ で PBP-3 と結合能を示し、最も高い親和性が認められたが PBP-1 および PBP-2 に対しては $10\ \mu\text{M}$ で結合能を示したが PBP-3 に対するものより低かった(Fig. 4-6、Fig. 4-7)。

○薬剤存在下におけるグルタミン酸の生産性

penicillin 効果として知られる penicillin G(PC G)のグルタミン酸生産への影響を調べるために、*C. glutamicum* ATCC31831 を 2 h 前培養し OD 660 が 0.3 に達した後に PC G を添加し、さらに 8 h 培養した後の培養液中のグルタミン酸を定量した。その結果、 $1\ \mu\text{M}$ の PC G で $53\ \text{mg/dl}$ のグルタミン酸が、またそれ以上の PC G でも同程度のグルタミン酸が培地中に存在することを確認した。次に、同様の実験を MPC、CEX について行った。MPC では $100\ \mu\text{M}$ を添加することで $57.5\ \text{mg/dl}$ のグルタミン酸が培地中から検出された。また CEX では $10\ \mu\text{M}$ 以上を添加することで、 $60\ \text{mg/dl}$ 以上のグルタミン酸が培養液中より検出された(Fig. 4-8)。これらの測定に用いた培地には $35\ \text{mg/dl}$ 前後のグルタミン酸が含まれているので培地中の値とこの値の差が細胞外への蓄積となり、各薬剤によるグルタミン酸の細胞外への蓄

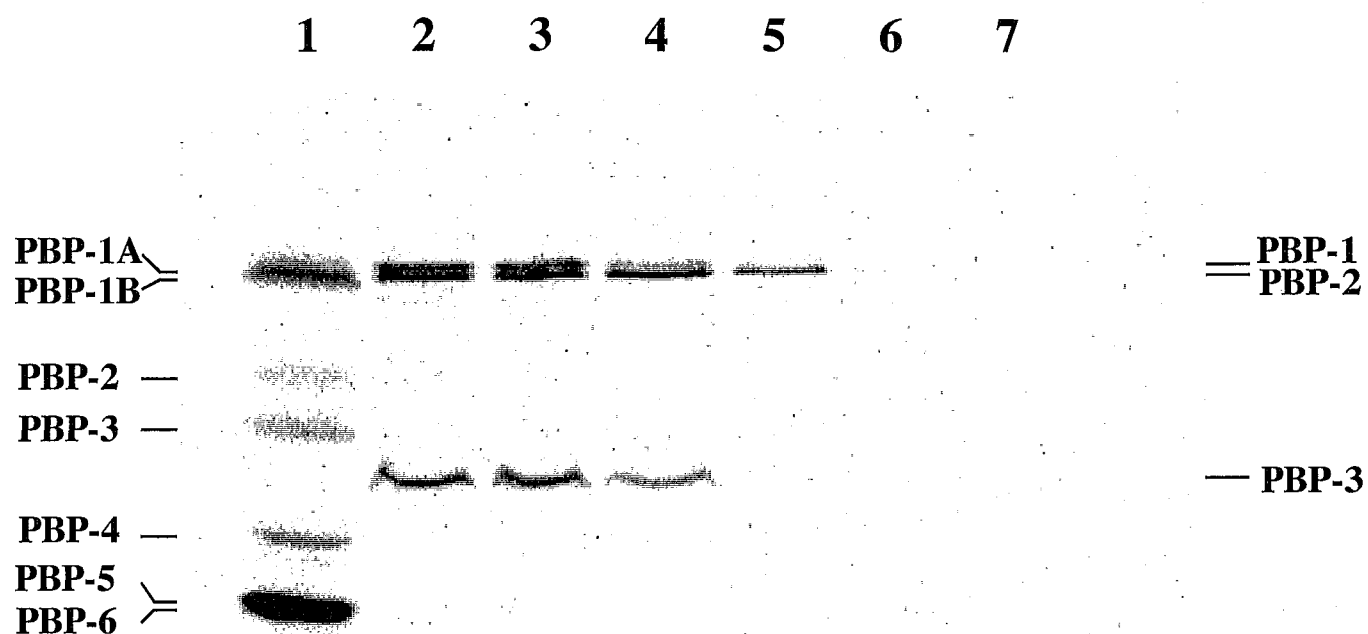


Fig. 4-2 Binding property of PC G and PBPs in *C. glutamicum* ATCC31831

Binding property was determined by detection of PBPs which were bound by 100 μM (Lane 2), 10 μM (Lane 3), 1 μM (Lane 4), 0.1 μM (Lane 5), 0.01 μM (Lane 6) and 0 μM (Lane 7) of ^{14}C -PC G. In lane 1, it was indicated PBPs of *Escherichia coli* CSH26 which were bound by 100 μM of ^{14}C -PC G.

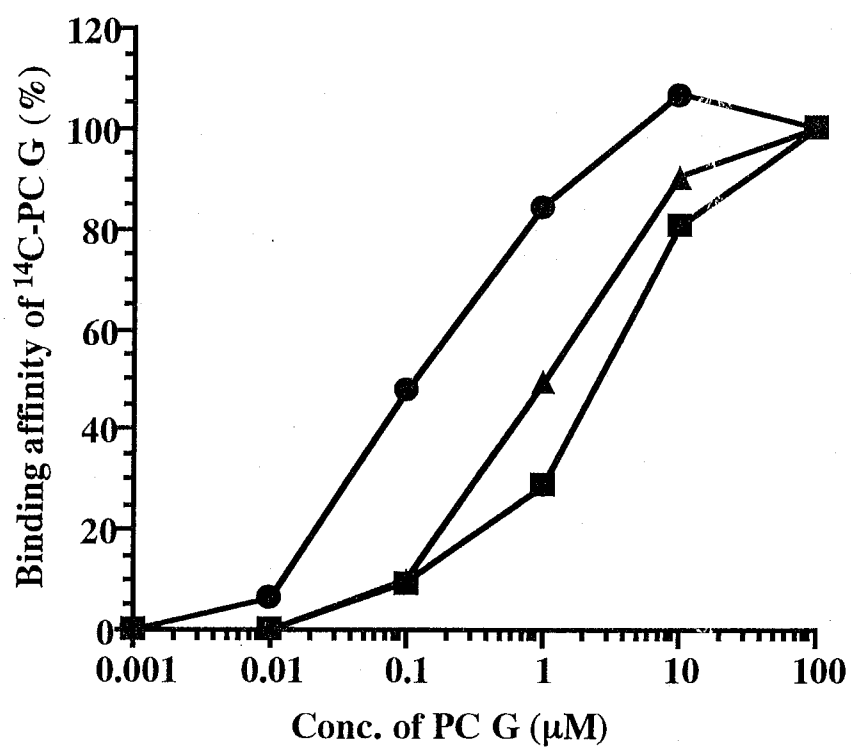


Fig. 4-3 Binding affinity of PC G and PBPs in *C. glutamicum* ATCC31831.

Binding affinity was determined by measuring radioactivity of ^{14}C -PC G which bound PBP-1 (squares), PBP-2 (circles) and PBP-3 (triangles) and calculated in percentages.

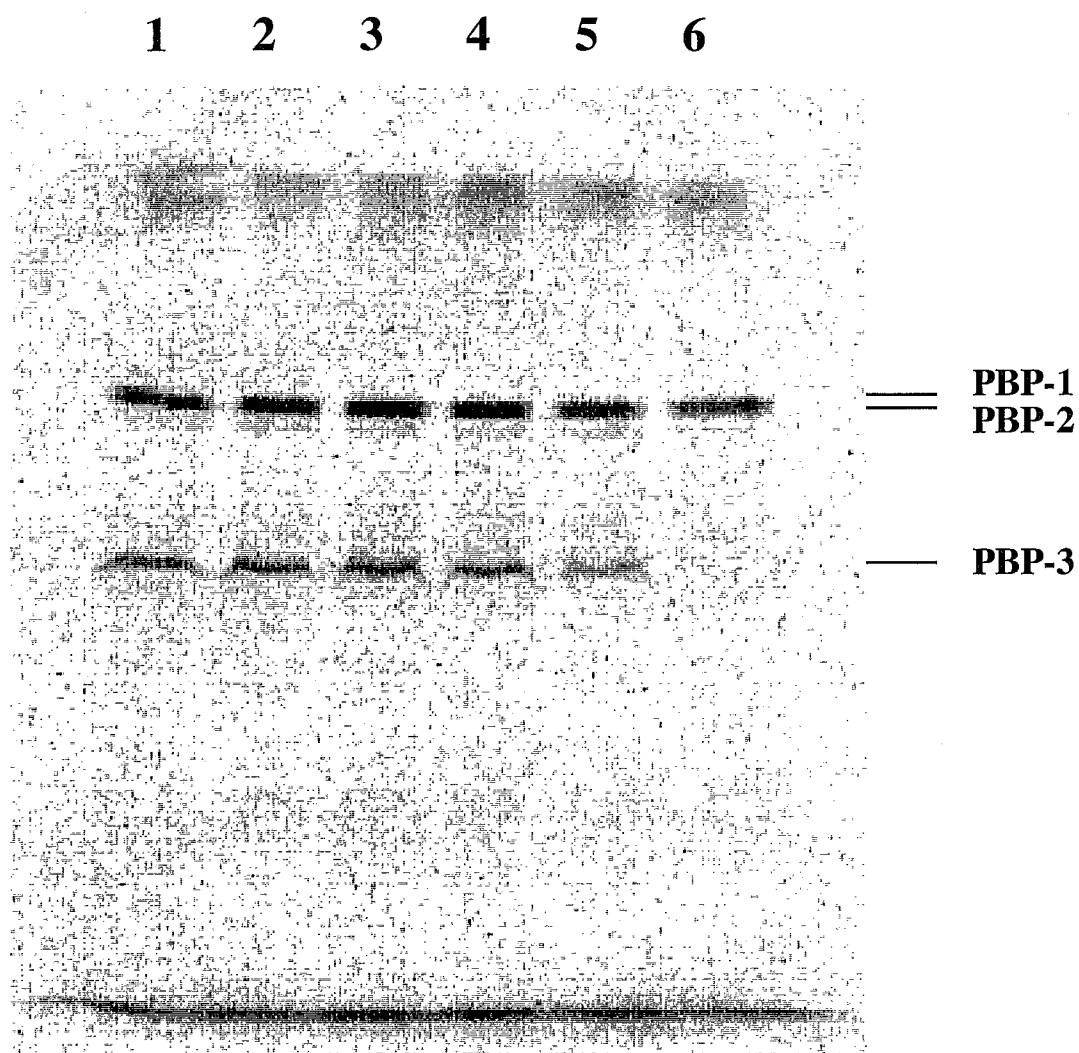


Fig. 4-4 Binding property of MPC and PBPs in *C. glutamicum* ATCC31831

Binding property was determined by detection of PBPs which were bound by ^{14}C -PC G after addition of 0 μM (Lane 1), 0.01 μM (Lane 2), 0.1 μM (Lane 3), 1 μM (Lane 4), 10 μM (Lane 5) and 100 μM (Lane 6) of MPC.

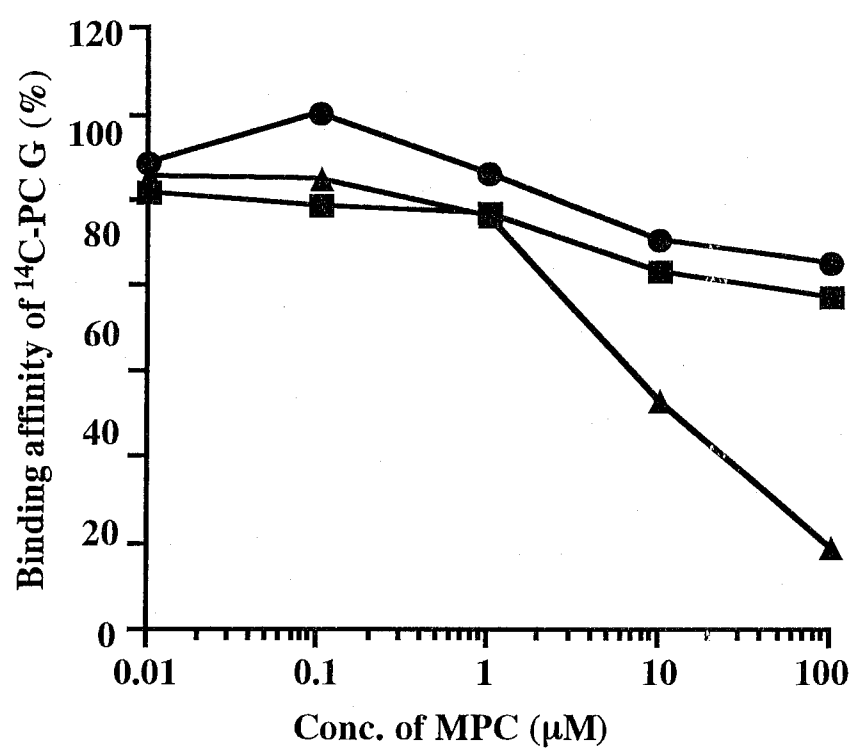


Fig. 4-5 Binding affinity of MPC and PBPs in *C. glutamicum* ATCC31831.

Binding affinity was determined by measuring radioactivity of ^{14}C -PC G which bound PBP-1 (squares), PBP-2 (circles) and PBP-3 (triangles) after addition of MPC and calculated in percentages.

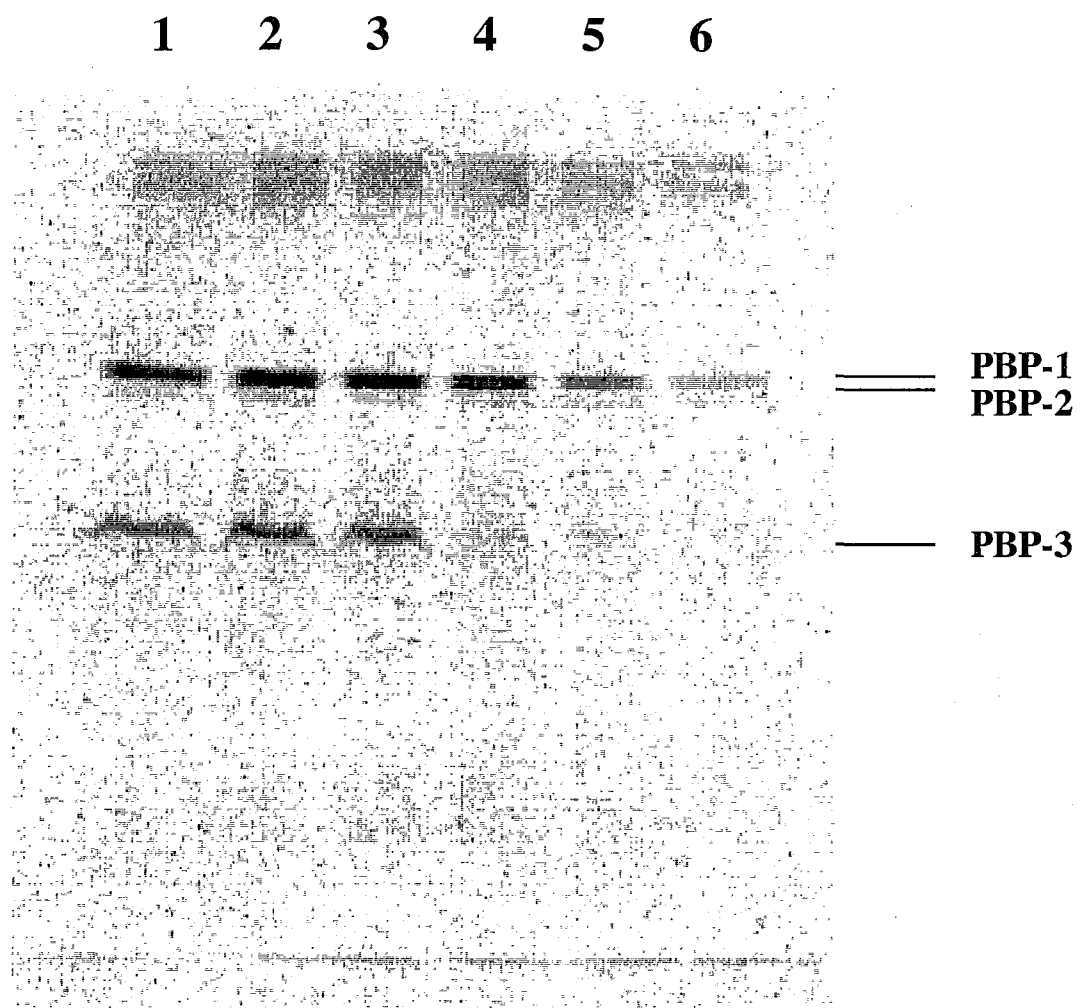


Fig. 4-6 Binding property of CEX and PBPs in *C. glutamicum* ATCC31831

Binding property was determined by detection of PBPs which were bound by ^{14}C -PC G after addition of 0 μM (Lane 1), 0.01 μM (Lane 2), 0.1 μM (Lane 3), 1 μM (Lane 4), 10 μM (Lane 5) and 100 μM (Lane 6) of CEX.

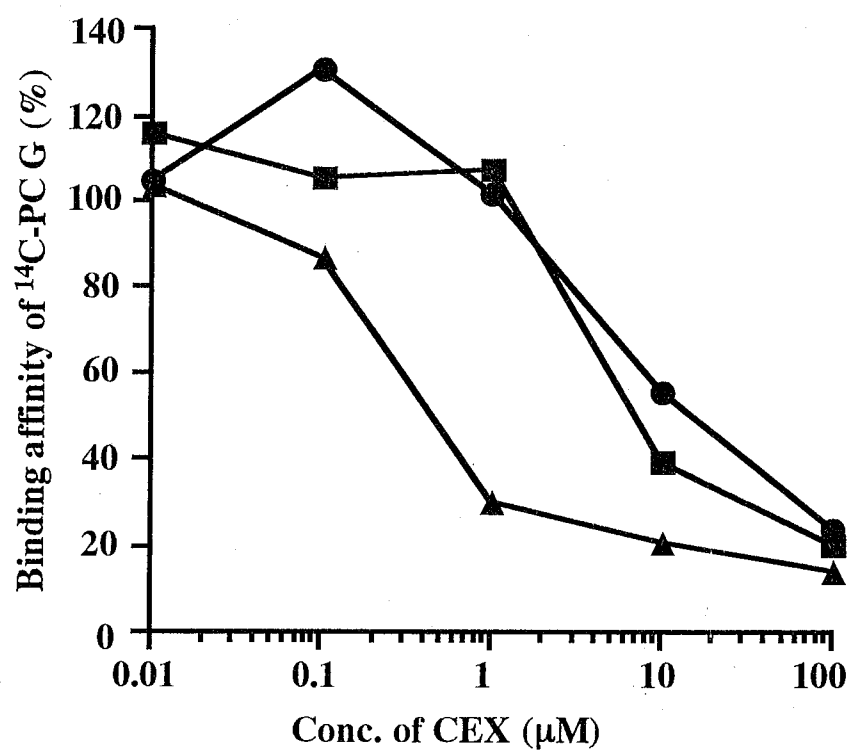


Fig. 4-7 Binding affinity of CEX and PBPs in *C. glutamicum* ATCC31831.

Binding affinity was determined by measuring radioactivity of ^{14}C -PC G which bound PBP-1 (squares), PBP-2 (circles) and PBP-3 (triangles) after addition of CEX and calculated in percentages.

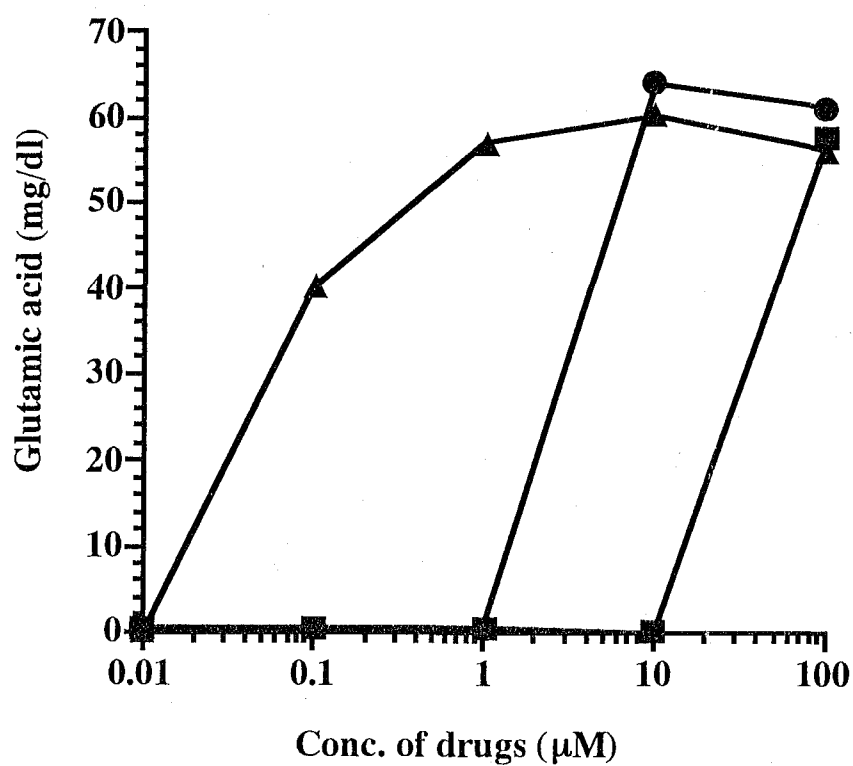


Fig. 4-8 Glutamic acid production by *C. glutamicum* ATCC3831 in the presence of PC G, MPC and CEX.

Cells were grown in L broth at 30 °C. PC G (triangles), MPC (squares) and CEX (circles) were added after incubation for 2 h and the cells were cultured for 8 h. After incubation, cells were removed from culture and used for measuring glutamic acid.

積が確認された。これらの結果は penicillin 類による *C. glutamicum* ATCC31831 を用いたグルタミン酸生産への関与を示すものである。次に、PC G とともにタンパク質合成阻害剤である chloramphenicol (CP) を用い以下の実験を行った。前述同様の前培養 2 h の後 PC G を添加し、8 h の培養を行う。その際、前培養後から 1 h 毎に CP を加え 10 h 目の培養液中のグルタミン酸濃度を測定した。薬剤を添加しない場合、培地中のグルタミン酸は 0 になった。これは *C. glutamicum* ATCC31831 が培養中に培地中のグルタミン酸を全て消費したためと考えられる。次に、CP のみを添加した場合、34.5 mg/dl のグルタミン酸が培地中に存在したが、もともと培地に含まれるグルタミン酸の量と同量であることから細胞外への蓄積はないと考えられる。次に、PC G と CP を同時に添加した場合、培地中から 55 mg/dl を最小値としてグルタミン酸が検出された(Fig. 4-9)。特に培養開始 2 h 目に CP のみを加えた場合と同時に PC G を加えた場合で明らかな蓄積量の違いが確認された。これは PC G がグルタミン酸生産の誘導に関与している重要な証拠と考えられる。次に、前述同様の培養過程で培養開始 2 時間目に CP によるタンパク質合成阻害をした後、1 h 毎に PC G を加えた際の培地中のグルタミン酸を定量した。その結果、CP と PC G を同時に添加した場合、培地中のグルタミン酸は 55 mg/dl であった。しかし CP 添加後 1 時間以上経過した後に添加すると培地中の濃度は 45 mg/dl より減少していった。これらの結果はグルタミン酸生産の継続にはタンパク質の合成が必要であることを示すと考えられる。

考察

本章において、今回初めてコリネ型細菌より PBP_s を検出し、またその解析を行った。*E. coli* においては 9 種類の PBP_s が検出されている。本実験にもちいたコリネ型細菌からは最大で 3 種類の PBP_s が検出された(Fig. 4-1)。そのうち特に *C. glutamicum* ATCC31831 の PBP_s を分子量の大きい順に PBP-1、PBP-2 および PBP-3 と名付け、その後の解析に用いた。*E. coli* においては、mecillinam (MPC) や

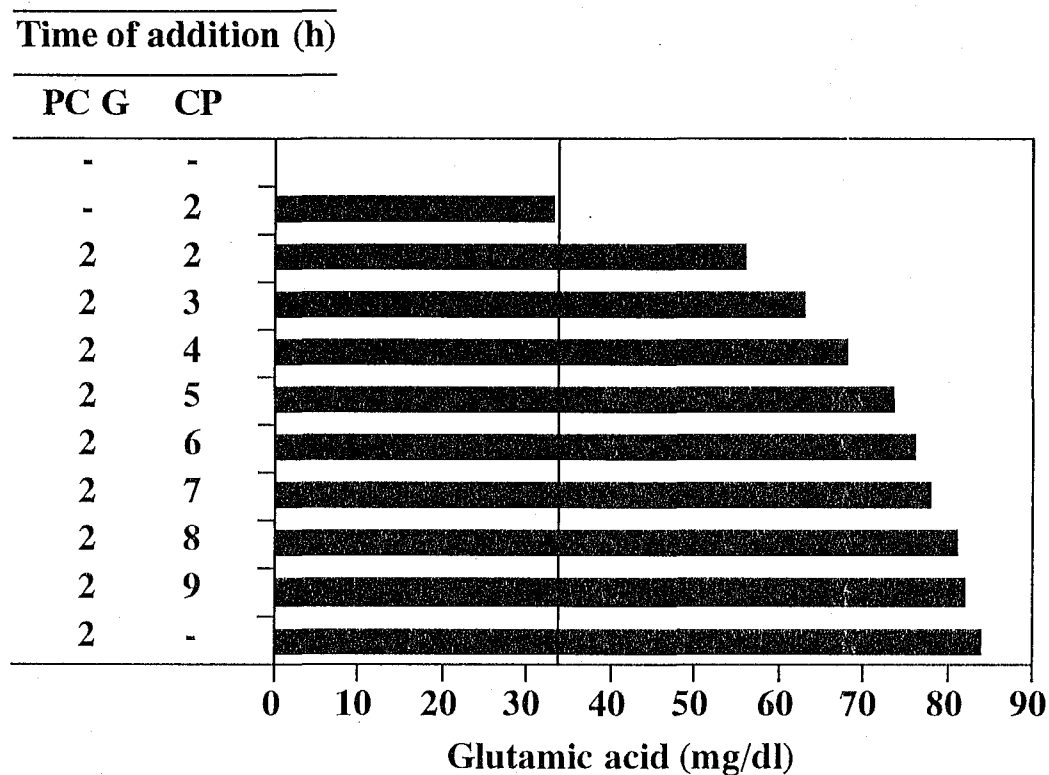


Fig. 4-9 Effect of PC G on glutamic acid production.

Cells were grown in L broth at 30 °C. 10 μ M of PC G was added after incubation for 2 h at OD 660 of 0.3. 12.5 μ g/ml of chloramphenicol (CP) was added at the time of every 1 h after the addition of PC G. After additional 8 h incubation, cells were removed from the culture and the supernatant was used for measuring glutamic acid concentration. A line which stay between 30 to 40 indicates the value of glutamic acid in L broth. Numbers in the left column indicate the time of drug addition after incubation. The - represents no addition of antibiotics.

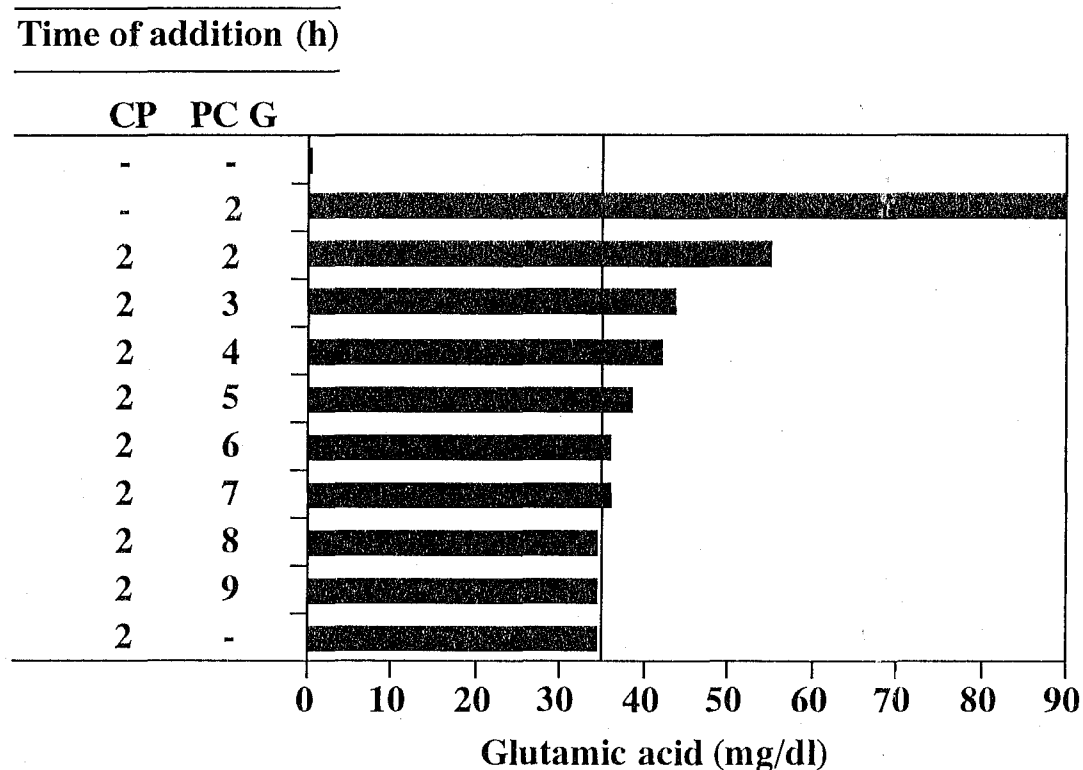


Fig. 4-10 Effect of CP on glutamic acid production.

Cells were grown in L broth at 30 °C. 12.5 µg/ml of chloramphenicol (CP) was added after incubation for 2 h at OD 660 of 0.3. 10 µM of PC G was added at the time of every 1 h after the addition of CP. After additional 8 h incubation, cells were removed from the culture and the supernatant was used for measuring glutamic acid concentration. A line which stay between 30 to 40 indicates the value of glutamic acid in L broth. Numbers in the left column indicate the time of drug addition after incubation. The - represents no addition of antibiotics.

cephalexin (CEX)がそれぞれ特異的に異なる PBPs と結合する。両薬剤の作用点はそれぞれ長軸方向の peptidoglycan を合成する PBP-2 および隔壁部分の peptidoglycan を合成する PBP-3 である。また、これらの薬剤添加に伴い MPC では球形にまた CEX では伸長化した形態を示す。このためこの両薬剤との親和性を調べることは PBPs の機能解析を進める上でも極めて有用である。そこで、*C. glutamicum* ATCC31831 より検出された PBPs の特徴を把握するため、penicillin G (PC G)および mecillinam (MPC)、cephalexin (CEX)との親和性を調べた。その結果、PC G は PBP-2 と $0.1 \mu\text{M}$ で高い親和性を示した(Fig.4-2、Fig.4-3)。また、MPC、CEX はともに PBP-3 と高い親和性を示し、それぞれの濃度は $100 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ であった(Fig.4-4、Fig.4-5、Fig.4-6、Fig.4-7)。*E. coli* でみられるような MPC、CEX の異なる PBPs への特異的な親和性は、コリネ型細菌においては認められなかった。

次に *C. glutamicum* ATCC31831 を用い、penicillin 類存在下におけるグルタミン酸の生産性について調べた。まず、penicillin 効果として知られる PC G では $1 \mu\text{M}$ で著量のグルタミン酸の細胞外への蓄積が確認された。PC G 等を添加しない条件では生産が確認できなかったのに対し、薬剤存在下ではその生産が確認された。このことは PC G がグルタミン酸生産の誘導に関与していることを示唆するものである。さらに PC G の誘導体である MPC、CEX 存在下においても同様にグルタミン酸の細胞外への蓄積が確認された。これらの薬剤が生産を誘導した濃度は PC G が MIC の 10 倍量で、また MPC、CEX では MIC と同じ値であった。この結果はグルタミン酸の細胞外への蓄積が致死に起因するものではないことを示唆する。またグルタミン酸の生産誘導は各薬剤が PBP-3 と高い親和性を示した濃度に一致したことから、PBP-3 が生産誘導のキータンパク質であると考えられる。さらにグルタミン酸生産能を持つ *C. glutamicum* ATCC31831 および *B. lactofermentum* ATCC13869 には 60 kDa の PBP-3 が存在したが、生産能を持たない *B. ammoniagenes* ATCC6892 や *B. acetylicum* ATCC953 に同一サイズの PBPs が存在しなかったことも興味深い点である(Fig. 4-1)。次に、PC G とタンパク質合成阻害剤である chloramphenicol (CP) を用いグルタミン酸の生産誘導の原因を調べた。培養中の *C. glutamicum*

ATCC31831 に CP のみを添加してもグルタミン酸の細胞外への蓄積は認められなかった。しかし、PC G を同時もしくはそれ以降に添加するとグルタミン酸の細胞外への蓄積が確認された(Fig. 4-9)。CP によるタンパク質の合成を阻害した後に PC G を加えても細胞外への蓄積は確認できた(Fig. 4-10)。これらの結果から、PC G はグルタミン酸の細胞外への蓄積を誘導する物質であることが示唆された。またこの際グルタミン酸の生産の継続には少なからずタンパク質の合成を伴う必要がある。ただし、すべてのタンパク質の合成が必要か否かは今後の研究に期待したい。また DNA 合成阻害剤である sparfloxacin を MIC の 10 倍量に相当する 12.5 mg/ml 添加した場合においても培地中のグルタミン酸量は 36 mg/dl で実験に用いた培地中の濃度と一致した(data not shown)。これらの結果から、*C. glutamicum* ATCC31831 におけるグルタミン酸の細胞外への蓄積は阻害的要因や致死による細胞外への漏洩ではなく、PBP-3 をキータンパク質として細胞内のエネルギーフローに変化が起きることによると考えられる。以上のことを模式化し Fig. 4-11 に示す。

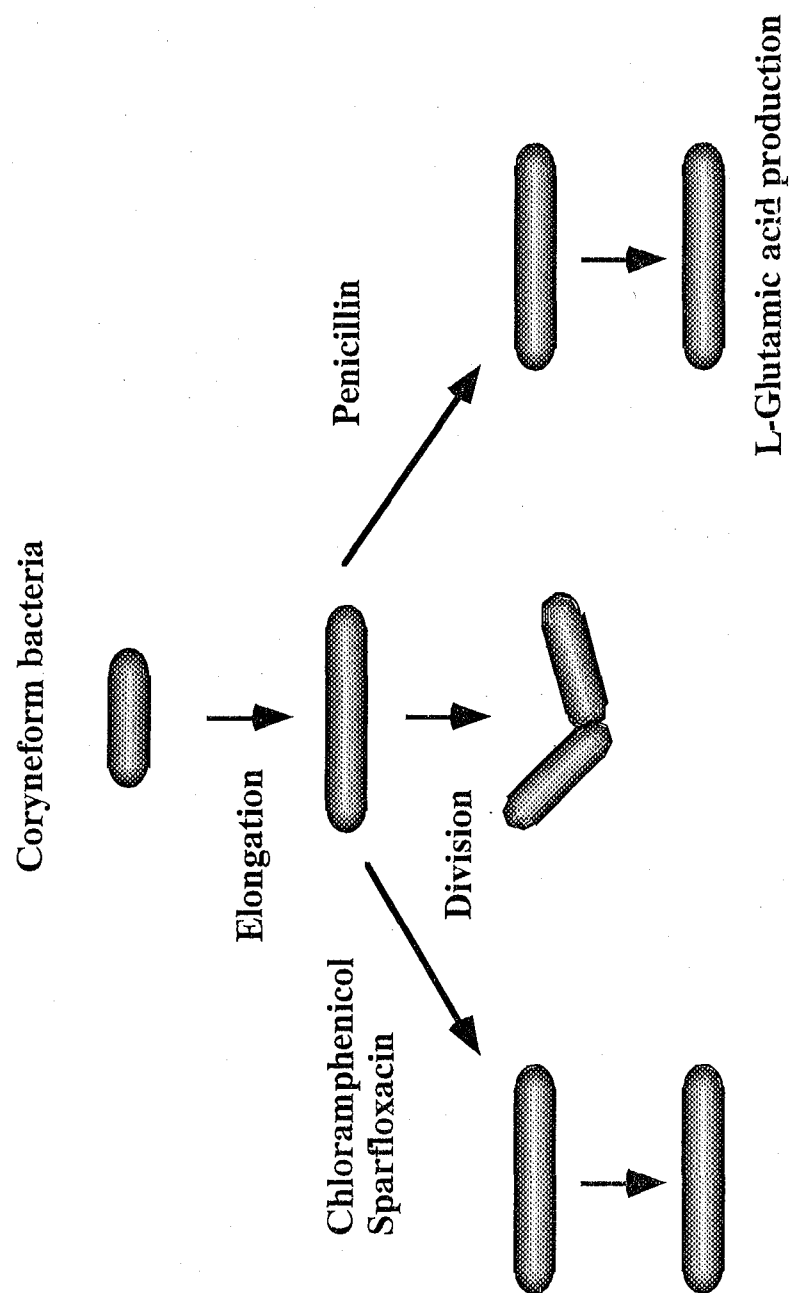


Fig. 4.11 Hypothetical model of amino acid production in coryneform bacteria.

要旨

コリネ型細菌を用いたグルタミン酸の発酵生産において、細胞壁合成阻害剤の penicillin G(PC G)を加えることで生産性を向上させる penicillin 効果が知られている。そこでまず PC G の標的である Penicillin-Binding Proteins(PBPs)を 4 種類のコリネ型細菌より ^{14}C -penicillin G を用い SDS-PAGE にて検出した。その結果グルタミン酸生産能を持つコリネ型細菌からは 3 種類の PBPs が検出され、それぞれの分子量約 110K、100K、60K であった。これらを分子量の大きい順に PBP-1、PBP-2、PBP-3 とした。しかしバリン生産菌やアミノ酸生産能を持たない菌は異なる PBPs 組成を示した。次に *C. glutamicum* ATCC31831 を用いさらなる解析を行った。*E. coli* においては PC G の誘導体である mecillinam (MPC)や cephalexin (CEX)が特異的に異なる PBPs に結合しその影響は形態的にも反映される。そこで同様の手法で *C. glutamicum* ATCC31831 について解析を行った。その結果 PC G は PBP-2 にまた MPC、CEX は PBP-3 に高い親和性を示した。またこれらの薬剤による形態への影響はほとんど認められなかった。次に 3 薬剤によるグルタミン酸の細胞外への蓄積を調べた。PC G では MIC の 10 倍量でまた MPC、CEX では MIC と同じ濃度で著量のグルタミン酸を蓄積する事を確認した。またこの濃度は PBP-3 が各薬剤と高い親和性を示す濃度であった。さらにタンパク合成阻害剤 chloramphenicol や DNA 合成阻害剤 sparflaxacin ではグルタミン酸の蓄積が認められなかった。これらのことから、penicillin 効果によるグルタミン酸の細胞外への蓄積はキータンパク質である PBP-3 を介し細胞内のエネルギーフローを変えることによっておこるもので、致死に伴う漏洩ではないと考えた。

コリネ型細菌からの *ftsZ* 遺伝子の分離と解析

はじめに

前章までにおいて、コリネ型細菌によるグルタミン酸の細胞外への蓄積と細胞分裂との密接な関係が示唆された。そこで本章においては細胞分裂遺伝子の一つ *ftsZ* 遺伝子のクローニングとその解析について報告する。*ftsZ* 遺伝子は *Escherichia coli* (Yi *et al.*, 1985a)、*Rhizobium meliloti* (Margolin *et al.*, 1991)、*Bacillus subtilis* (Beal *et al.*, 1988)、*Streptomyces coelicolor* (McCormick *et al.*, 1994)において既にクローニングされている。また、これらの配列には保存性の高い領域が含まれている。また、すべての真性細菌において FtsZ タンパク質は高い相同性領域として N 末端領域に GTP-binding motif を持ちまた C 末端領域には変化に富んだ親水性領域がある (Wang *et al.*, 1996)。*ftsZ* 遺伝子産物は細胞分裂の初期段階で機能し、細胞の長軸方向における中心部分に分裂環(*ftsZ* ring)を形成する (Bi *et al.*, 1991、Lutkenhaus *et al.*, 1993、Addinal *et al.*, 1996)。またこの分裂環は隔壁を形成する際に FtsZ 単量体の足場となりその後の段階に進める。FtsZ 単量体の重合は GTP の加水分解によって制御されている (de Boer *et al.*, 1992、RayChaudhur *et al.*, 1992)。*E. coli* および *Bacillus subtilis* において FtsZ は精製され、それらが GTP の加水分解能を持つことが報告されている (de Boer *et al.*, 1992、RayChaudhur *et al.*, 1992、Mukherjee *et al.*, 1993、Wang *et al.*, 1993)。さらに、このタンパク質は GTP 存在下において重合し filaments を形成することも報告されている (Mukherjee *et al.*, 1993、Bramhill *et al.*, 1994)。これらの結果は FtsZ が細胞骨格様の機能を持つことを示すものである。このため、*E. coli* (Dai *et al.*, 1991)および *Bacillus subtilis* (Beal *et al.*, 1991)において細胞分裂と生存において基本的要素として考えられており FtsZ に関する研究は分裂の機構解明につながる (Hale *et al.*, 1997、Rothfield *et al.*, 1997)。さらにコリネ型細菌においては前述の通りアミノ酸代謝にもつながる可能性を秘めている。しかしながら、コリネ型細菌における細胞分裂に関する分子遺伝学的な知見は皆無である。本菌は細胞分裂の際スナッピングと呼ばれる特有の分裂様式を呈する。そこで、これらの分裂様式の解明の第一歩として、本章においてはコリネ型細菌の一種である *Brevibacterium flavum* MJ233 より分離した *ftsZ* 遺伝子とその解析について示す。

材料と方法

○供試菌株及び培養条件

B. flavum MJ233 (Kurusu *et al.*, 1990)を染色体 DNA の調製およびライブラリー作成に用いた。

○*B. flavum* *ftsZ* の増幅

FtsZ タンパク質のアミノ酸配列のうち保存性の高い領域(GVGGGGDNAV および AGTGAAP)から縮重したオリゴヌクレオチド(degenerate oligonucleotides)プライマー 5'-GGNGTNGGNGGNGGNGGNGAYAAAYGCNGT-3' および 5'-GGNGCNGCNCNGTNCNGC-3'を合成した。これを用い PCR 法にて *B. flavum* MJ233 の染色体を増幅した。PCR は Taq polymerase および Perkin-Elmer-Cetus thermal cycler を用い以下のプログラムを 25 サイクル行った(94 °C 1 min、37 °C 1min および 72 °C 2 min)。増幅した DNA 断片は pCR1000 (Invitrogen, San Diego, CA, USA)へクローニングした。

○*B. flavum* からの *ftsZ* 遺伝子分離

B. flavum MJ233 (Kurusu *et al.*, 1990)の染色体 DNA ライブラリーを Inui ら (21)の方法に従い作成した。染色体ライブラリーのスクリーニングは前述の PCR 産物をプローブとして用いいくつかの有効なクローンを得た。組換えラムダファージを各種制限酵素により消化処理した結果得られたクローンには約 4.1 kb の *EcoRI* 断片を含んでおり、プローブとハイブリッドを形成した。得られた *EcoRI* 断片を pUC118 または pUC119 (宝酒造社製)の *EcoRI* サイトにクローニングしそれぞれを pUC118-Z or pUC119-Z と名付けた。

○塩基配列の決定

2 本鎖 DNA を用い塩基配列を決定した(Sanger *et al.*, 1977)。断片をクロー

ニングしたプラスミド pUC118-Z および pUC119-Z から、deletion kit (宝酒造社製) を用い挿入部分を切り縮めた各種プラスミドを作成し塩基配列の決定に用いた。シーケンスサンプルは *Taq* polymerase(Perkin-Elmer 製)を用いた。全配列をギャップが生じることなく決定するため必要に応じプライマーを作成し、塩基配列を決定した。

○顕微鏡観察

細胞形態は位相差顕微鏡にて観察した。

○*ftsZ* 遺伝子の過剰発現

B. flavum 由来の *ftsZ* 遺伝子を発現ベクター pTrc99A(Pharmacia 製)にクローニングし大腸菌内で過剰発現をした。この際二種類の PCR による増幅断片を作成しそれぞれを *Sall* - *HindIII* サイトに挿入したプラスミドを pTrc-L および pTrc-S とした(Fig. 5-4)。

○*in vitro* タンパク質合成

第二章の方法に従った。

○塩基配列の accession number

決定した *B. flavum ftsZ* 遺伝子の塩基配列から GenBank accession number AB003132 を得た。

結果

○PCR による *B. flavum ftsZ* 断片の増幅

E.coli (Yi *et al.*, 1985a)、*R. meliloti* (Margolin *et al.*, 1991)、*Bacillus subtilis* (Beal *et al.*, 1988) および *S. coelicolor* (McCormick *et al.*, 1994) の *ftsZ* 遺伝子は既にクローニングされ塩基配列の決定がなされている。これらの塩基配列から予想されるアミノ酸配列には高い相同性をもつ領域が含まれている。特に N- 末端は顕著である(Fig.

5-2)。これらの知見を基に、本研究では *B. flavum* MJ233 より *ftsZ* 遺伝子を増幅するため、縮重したオリゴヌクレオチド(degenerate oligonucleotides)プライマーを設計し、*Brevibacterium flavum* MJ233 の染色体を鋳型に増幅した。*B. flavum* から得た PCR 産物は pCR1000 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) にクローニングし塩基配列を決定した。得られたアミノ酸配列は *E. coli*、*R. meliloti* および *Bacillus subtilis* の FtsZ 遺伝子と高い相同性を示した。(Fig. 5-2)。この結果より得られた PCR 産物には目的とする断片が含まれていることが確認された(data not shown)。

○*B. flavum* *ftsZ* 遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定

B. flavum MJ233 (Kurusu *et al.*, 1990) の染色体ライブラリーは PCR 断片をプローブとし選抜し、いくつかの有効なクローンを得た。組換えラムダファージを各種制限酵素により消化した結果、約 4.1 kb *EcoRI* 断片を含んでいた。さらにこの断片は前述の PCR 断片とハイブリッドを形成した(data not shown)。得られた約 4.1 kb の *EcoRI* 断片の塩基配列は dideoxy 法(Sanger *et al.*, 1977)にて決定した。決定した塩基配列を解析した結果、一つの大きな ORF の開始コドンの 8 塩基上流に RBS (Ribosome Binding Site) AAAGGCGAGA が確認された。予想されるアミノ酸配列からこの ORF は *ftsZ* 遺伝子であり、その全配列が得られた。*ftsZ* 遺伝子は 438 アミノ酸からなり、分子量 46.9 kDa のタンパク質をコードしていた。またこの分子量は *in vitro* protein synthesis assay (Fig. 5-6) によって得られた値にも一致した。得られた塩基配列から予想されるアミノ酸配列は *E. coli*、*R. meliloti*、*Bacillus subtilis* および *S. coelicolor* の FtsZ とそれぞれ 45.3%、49.7%、55.3% および 67.6% と高い相同性を示した(Fig. 5-2)。また、本配列からは GTP binding motif (GGGTGTG; 11-13) や GTP 加水分解領域(NLDFADV; 16)も確認された。*ftsZ* に加え上流に別の ORF も確認された。この ORF の予想されるアミノ酸配列は *S. coelicolor* の FtsQ (McCormick

primer1 AAAGGCGAGACATCGACA
 SD
 CTGATGGGTGTGGGCTCTGCACGTGGGACAAACCGCGTTGTCTCTGCAACCGAGCAGGCC
 L M G V G S A R G D N R V V S A T E Q A
 ATCAACTCTCCACTTCTCGAAGCAACCATGACGCGCGAACTGGCGTCTGTGTCTCTTT
 I N S P L L E A T M D G A T G V L L S F
 GCTGTGGATCCGACCTGGGCTCATGGAAGTCAACGACGCTGCATCCATGGTCCGTGAG
 A G G S D L G L M E V N A A S M V R E
 CGTCCGATGAAGATGTCAACCTCATCTTCGGTACCATCATCGACACAACTGGGCGAC
 R S D E D V N L I F G T I I D D N L G D
 GAAGTCCGCGTAACCGTCATCGGACCGGTTTGAAGAGCTCGCGCAACCGCGCTGAG
 E V R V T V I A T G F D A A R A S A E
 AACCGCGCGAGGCATCCAGCTGCACCTGAGTGAAGCAAGCAATCTCGGTGAGGAGACCGTC
 N R R A G I P A A P A A E P V Q Q Q V
 CCAACCAACCAACCGCAACCTTCCACGAGAGAGAAAGCAATCTCGGTGAGGAGACCGTC
 P T T N A T L P P E K E S I F G G A R E
 GAGAACGATCCTTACCTGTCCCGCTCTGTGTGACGCTCATCGCAATGAGGAGACCGTC
 E N D P Y L S R S A G A R H R I E E T R
 TCCGCGGTGGACTCTTCAACCGGCAATGATCGGATTAACGCTGATGAGCGCGC
 S G G G L F T T G N D R D Y R R D E R R
 GAAGATCATCGTGACGAGCGCGCGATGACCGTTCCTACGACCGCGTGTGATGATCGTCGT
 E D H R D E R R D D R S Y D R R D D R R
 GACGATCGCGCGATGACCGCGGAGACGACCTGGATGTACCGAGTTCCTCCAGTAA
 D D R R D D R G D D L D V P S F L Q *
 primer3
 oligo1
 ATGACCTCACCGAACAACCTACCTCGCCAAAGATTAAAGTCTGCGGTGGGCGGCGGA
 M T S P N N Y L A K I K V V G V G G G
 oligo2
 GATAATGCTGTCAACCGCATGATTGAAGAAGGCCTCAAGGCTGGAGTTTCATCGCGGTG
 D N A V N R M I E E G L K G V E F I A V
 AACACGACTCGCAGGCTCTCATGTTCTCTGATGCCGACGTAAGCTCGATATCGGACGT
 N T D S Q A L M F S D A D V K L D I G R
 GAAGCTACCCGTGTTGTCGCGCGGCGGAACCCAGAGTTGGACGTGCCTCGGCAGAG
 E A T R G L G A G A N P E V G R A S A E
 TATCAAGAAGCAAAATCGAAGAACCATCAAGGCGCGGACATGTTCTCGTTACCGCC
 Y H K N E I E E T I K G A D M V F V T A
 GCGAAGGTGGTGGGCGGTAAGGAGCTGCAACGAGTGTGGGACGAGTCCCAAGAAG
 G E G G A G T G A A P V V G R I A K K
 oligo2
 ATGGGCGCACTGACCATGTTGTGACCAAGCCTTTCAGTTTCGAAAGCCGTGCGCGT
 M G A L T I G V V T K P F E F E G R R R
 ACTCGCAGCAGAAAGGCGATCGCAGCACTGAAGGAGTCTGCGACACTCTCATCGTT
 T R Q A E E G I A A L K E V C D T L I V
 ATTCCAAACGACCGCCTGCTGAGCTGGGCGATGCTAAACCTGTCCATCATGGAAGCGTTTC
 I P N D R L L E L G D A N L S I M E A F
 CGCGCAGCCGATGAAGTTCTCCACAATGGTGTTCAGGGTATTACCAACCTGATCACCATC
 R A A D E V L H N G V Q G I T N L I T I
 CCTGTATCAACGTGGACTTCGCGGACGTTTCGTCCTCATGTCCGAAAGCTGGTTCGCA
 P C I N V D F A D V R S V M S E A G S A

Fig.5-1 Nucleotide Sequence of *ftsZ* gene.

The predicted aa sequence for FtsZ is indicated underneath the first nucleotide (nt) of each codon. A putative RBS is boxed. An asterisk mark is stop codon. Oligos 1 and 2 for PCR amplification have been underlined. Primer1 to 3 for cloning of *ftsZ* ORF into pTrc99A have been arrowed. C-terminus hydrophilic region have been thickly underlined. The nt sequence presented in this figure has been deposited in GenBank/EMBL under the accession number AB003132.

(a)	1:-----MTSPNNYL-AKIKVVGVGCGGDNVAVNRMIIEGLKGVETIAVNTDSQALMFSADAV	54	(a)	293:IDDMLGDEVRTVIATG---FDAARASAAENRRAGIPAAAPPVQVQQVPTTINATLPP	349
(b)	1:-----MPEPMELTNDVAVIKVIGVGGGNAVEHVRERIBGVFFAVNTDAQALRKTAVGQ	56	(b)	297:SLDPDMNDELRTVTVATGIGMDKRPEITLVTKNQVQPVMDRYQQHGMPLTQEQPVAK	356
(c)	1:MAINLQKPDITELKPRITVFCVGGGCGGNVANNMITAGLQGVDFVAVNTDAQALTMTKAER	60	(c)	301:TFDEELEGIRVSWATGIDRTAAEVAGRSADRPVPAPKPIVRPSAAPPQPTVSLQP	360
(d)	1:M-LFEF-TNIDGL-ASIKVIGVGGGCGGNVAVNRMIENIEVQGVYEYIAVNTDAQALNLSKAEV	57	(d)	297:VINENKDEIVTVIATGTFTEQEKDVT-K-PQ-RPSLNQSIKTHNQSV-RRDAKRE-EP	351
(e)	1:-----VAAPQNYL-AVIKVIKVGCGGCGGNVAVNRMIIEVGLKGVETIAVNTDAQALLMSADAV	54	(e)	294:VIDDALGDEVRTVIATG---FDGCG---PP-SKRDNVLGSSSAK--REPTPARPSESRP	345
	* * * * *			* * * *	
(a)	55:KLDI GREATRGICAGANPEVGRASAEYHKNJEETIKGADMVFYTAGGGGAGTGGAAPW	114	(a)	350:--EKESIFGARENDPYSRSAGARHRIETETRSGGGLFTTGNDRDYRRDERREDHR-D-	405
(b)	57:TIQISGITKGLGAGANPEVGRNAAEDDRALRALEGADMVFIAGMGCGTGTGAAPW	116	(b)	357:VYNDNAPQTAKEPDYLDIPAFLRKQAD-----	383
(c)	61:IIQMGVAVTEGLGAGSQPEVGRNAAEBCIDEIIDLQCTHCFVTAGMGCGTGTGAAPIV	120	(c)	361:VPQPVPQPLQQQNVVDHIALAIREAEMERELDIAARAQVAAPAPQPQPHLQEEAFRPS	420
(d)	58:KMQIGAKLTRGLGAGANPEVGRKAAEESKEQIEEALKGADMVFYTAGGGGCGTGTGAAPVI	117	(d)	352:--QQQNTVSRH-TSQPAD-D-TLDIP-TFL-R--NRNKRQ-----	382
(e)	55:KL DVCRELTRGLGAGANPAVGRKAAEDHREIEEVILKGDVFTAGGGGCGTGTGAAPW	114	(e)	346:--SFGS-LGSVKFKEEP-E-PAPVPEPVADLPVSP-PPVPSPTY-SDSAAEEL--D-	393
	* * * * *				
	I				
(a)	115:GRIAKMGALTIQVTKPFPEFEGRRRTQAEIGIAALKEVCDTLIVIPNDRLLLELGANL	174	(a)	406:ERRDRSYDRRDD-RRDRRDRDGDLDVP--SFLQ-----	438
(b)	117:AEVAKDLGITVAVTKPFNPEFEGKRMFAEQGITELSKHNSLITIPNDKLLKVLGRGI	176	(b)	-----	
(c)	121:AQAARKGILTVGVTKPFNPEFEGRRRIADQGISDLQSKVDTLIVIPNQNLRIANDKT	180	(c)	421:KLFAGVAPTEAAPVMPAPQAPRPVEMQAPVQPMQAPVQVQEQPTQVVRQQAEPVRMPKV	480
(d)	118:AQIAKDLGALTGVVTRPFTFEGRRQLQAAGGISAMKEAVDTLIVIPNDRILLEIVDNT	177	(d)	-----	
(e)	115:ANIRSLGALTIQVTRPFTFEGRRRANQAEQIAELREEDVTLIVIPNDRLLSISRQV	174	(e)	394:--VP-D--FLK-----	399
	* * * * *				
	II				
(a)	175:SIMAFRAADEVLHNGVQGITNLITIPC-INVDFAVRSVMSEAGSALMGVSGARGDNV	233	(a)	-----	
(b)	177:SLDFAFANDVLKGVQGI AELITRPGMLNVDFADRTVMSEGMHMGSGVASGEDRA	236	(b)	-----	
(c)	181:TFADAFAMADQVLYSGVACITDLMVKEGLINLDFADVRSVMREMGAMGTGEASGEGRA	240	(c)	481:EDFPPVVKADMDYRTQAPAHQEEERGPMGLLNRIITSSGLREREATNVSDDMTAAAPSA	540
(d)	178:PMLEAFREADVNRQVQGISDLIATPGLINLDFADVTKMSKGSALMGIGIATGENRA	237	(d)	-----	
(e)	175:SVLDAFKSADQVLLSGVQGITDLITTPGLINLDFADVKSVMSEAGSALMGIGSARGDDRA	234	(e)	-----	
	* * * * *				
	II				
(a)	234:VSATQAINSPLL-EATMDGATGVLLSFAGGSDLCLEVNAAASVMYRERSDEDVNLIFGT	292	(a)	-----	
(b)	237:EEAEAMAISSPLEDIDLSGARGVLNITAGFDLRLDEFETVGTIRAFASDNATVIGT	296	(b)	-----	
(c)	241:MAAAEAAIANPLDSESMKGAQGLLISITGGRDLTLFEVDEAAATRIEEVDPPDANIILGA	300	(c)	541:SQQRRLSPEASLYAPRRGLDDHGRAAPQWRSHEDDLEIPAFILRRQSS	590
(d)	238:AEAAKAISPLL-EAATDGAQGVLMNITGCTNLSLYEQEAADIVASASDQDVNMFPS	296	(d)	-----	
(e)	235:VAAAEMAISSPLL-EASIDGARGVLLSISGGSDLCGLFEINEAAQLYSEAAHPEANIIFGA	293	(e)	-----	
	* * * * *				

Fig.5-2 Multi-Alignment of FtsZ proteins.

Deduced aa sequences of the *ftsZ* gene products from (A) *Brevibacterium flavum*, (B) *Escherichia coli*, (C) *Rhizobium meliloti*, (D) *Bacillus subtilis*, (E) *Streptomyces coelicolor*. Identical residues are indicated by asterisks. Dashes represent gaps inserted in order to optimize the protein alignment. Putative GTP binding site and GTP-hydrolyzing region that show an almost perfect match with consensus sequence were indicated by boxes I and II.

et al., 1994)と高い相同性を示した。*ftsQ* 遺伝子上流には細胞壁合成に関与する *murC* 遺伝子の C 末端相同配列が確認された。*ftsZ* 遺伝子下流には二つの ORF が存在しそれぞれ ORF4 および ORF5 と名付けた。しかしながらその機能は不明であった(Fig. 5-3)。

○*E. coli* JM109 における *B. flavum* 由来 *ftsZ* 遺伝子の発現

E. coli 細胞内における、得られた *B. flavum* 由来 *ftsZ* 遺伝子産物の挙動を調べた。*ftsZ* 遺伝子を PCR 法にて増幅し *E. coli* 用発現ベクター pTrc99A (Amann *et al.*, 1988)の *SalI* - *HindIII* サイトに自己の RBS と共にベクターの *trc* プロモーターの支配下にクローニングした。これによって得られたプラスミドを pTrc-L とした。また、得られた *ftsZ* 遺伝子には、親水性に富む C 末端領域が含まれており、この部分に相当する 62 アミノ酸残基を取り除き pTrc99A の *trc* プロモーターの支配下にクローニングしたものを pTrc-S とした。両プラスミドは *lacI^q* 遺伝子によりその発現量が厳密に制御されている。

pTrc-L または pTrc-S を含んだ *E. coli* JM109 は IPTG に対し敏感な変化を示した。1 mM の IPTG で *B. flavum* 由来 *ftsZ* 遺伝子を誘導発現させると顕著な生育阻害が認められた(Fig. 5-4)。0.1 mM の IPTG で誘導した場合、*E. coli* JM109/pTrc-L はその生存率を劇的に減らした。しかし *E. coli* JM109/pTrc-S ではそのような変化は確認できなかった。次に IPTG 誘導による形態への影響を顕微鏡下で観察した(Fig. 5-5)。IPTG を培養中の *E. coli* JM109/pTrc-L および *E. coli* JM109/pTrc-S に添加するとどちらの細胞も伸長化した。

考察

既にクローン化されている *Escherichia coli*、*Rhizobium meliloti* および *Bacillus subtilis* の *ftsZ* 遺伝子の保存領域を基に縮重したオリゴヌクレオチド(degenerate oligonucleotides)プライマーを設計し、PCR および hybridization によって *ftsZ* を含む

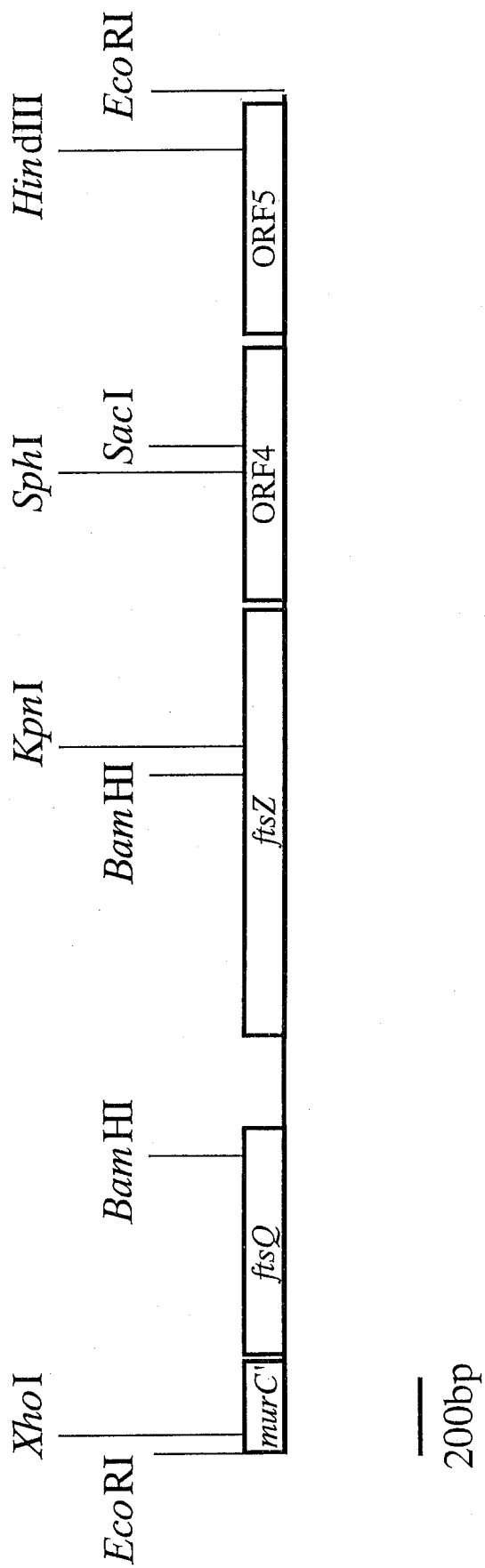
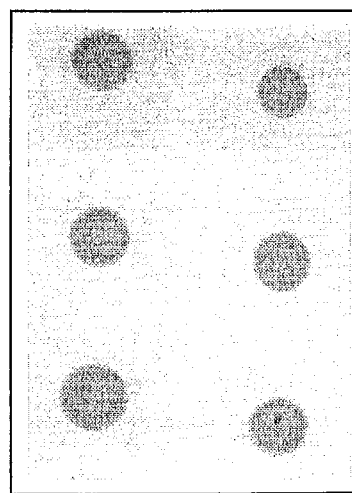


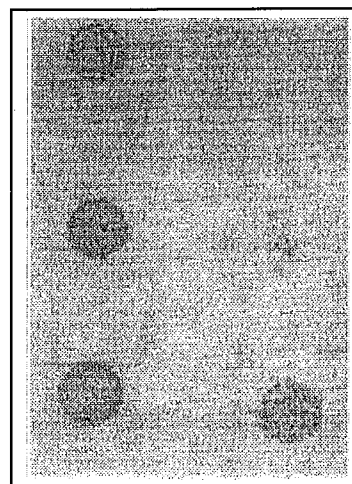
Fig. 5-3 Map of the Cloned 4,116 bp *EcoRI* fragment.

Restriction map and gene alignment of the cloned approx. 4.1 kb *EcoRI* fragment were shown.

Top



ORF-S



ORF-L

0 mM

0.1 mM

1 mM (IPTG)

Bottom

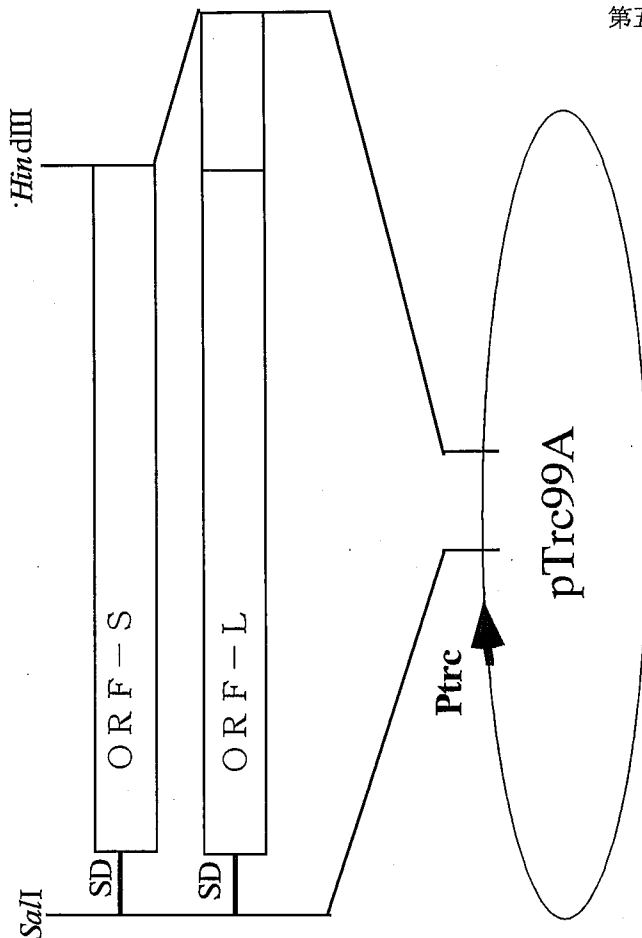


Fig. 5-4 IPTG sensitive phenotype.

Top: Each spots contain 10^7 , 10^6 , and 10^5 cells from left to right in the each panel. Upper line or lower line show JM109 spots containing pTrc-S or pTrc-L, respectively. The left, middle, and right panels show JM109 cells after the induction with 0, 0.1, and 1mM IPTG, respectively.

Bottom: An approximately 1.3-kb PCR fragment encoding the *B. flavum ftsZ* coding region with or without its C-terminus hydrophilic region was inserted into *SalI-HindIII* digested pTrc99A expression vector DNA in order to create a plasmid pTrc-L and pTrc-S, respectively. The PCR was used to create a *SalI-HindIII* fragment encoding the *B. flavum M1233 ftsZ* gene. The sequences of the primers used were as follows: 5'-GTCGACAAAGGCGAGACATCGACAATG -3' (primer1) for the N-terminus of the fragment containing a RBS, and 5'-AAGCTTATTACTGGAGGAAGCTGGGTAC -3' (primer3), 5'-AAGCTTATCAATGCGATGACGTGACCA -3' (primer2) for the C-terminus of the fragment (Fig. 5-1) for ORF-L and ORF-S, respectively. The sequence of the PCR fragment cloned in the plasmid pTrc-L or pTrc-S was verified.

4.2-kb の *EcoRI* 断片を得た。解析の結果 *E. coli*、*R. meliloti*、*Bacillus subtilis* および *S. coelicolor* の FtsZ と高い相同性を示した。本遺伝子の C 末端領域には親水性に富む特異な配列が存在した。また、*ftsZ* 遺伝子上流には *ftsQ* 遺伝子、さらに上流には *murC* 遺伝子に相同な領域の存在が確認された。*E. coli* や *Bacillus subtilis* において、細胞分裂に関連した遺伝子は染色体上の数カ所にクラスターを形成している。その点からも理にかなった配列と思われる。また、もっとも高い相同性を示した *S. coelicolor* では *ftsZ* 遺伝子上流には *ftsQ* 遺伝子が、またさらに上流には *murC* 遺伝子、下流には未知のタンパク質とその配列にも極めて高い類似性が認められた。

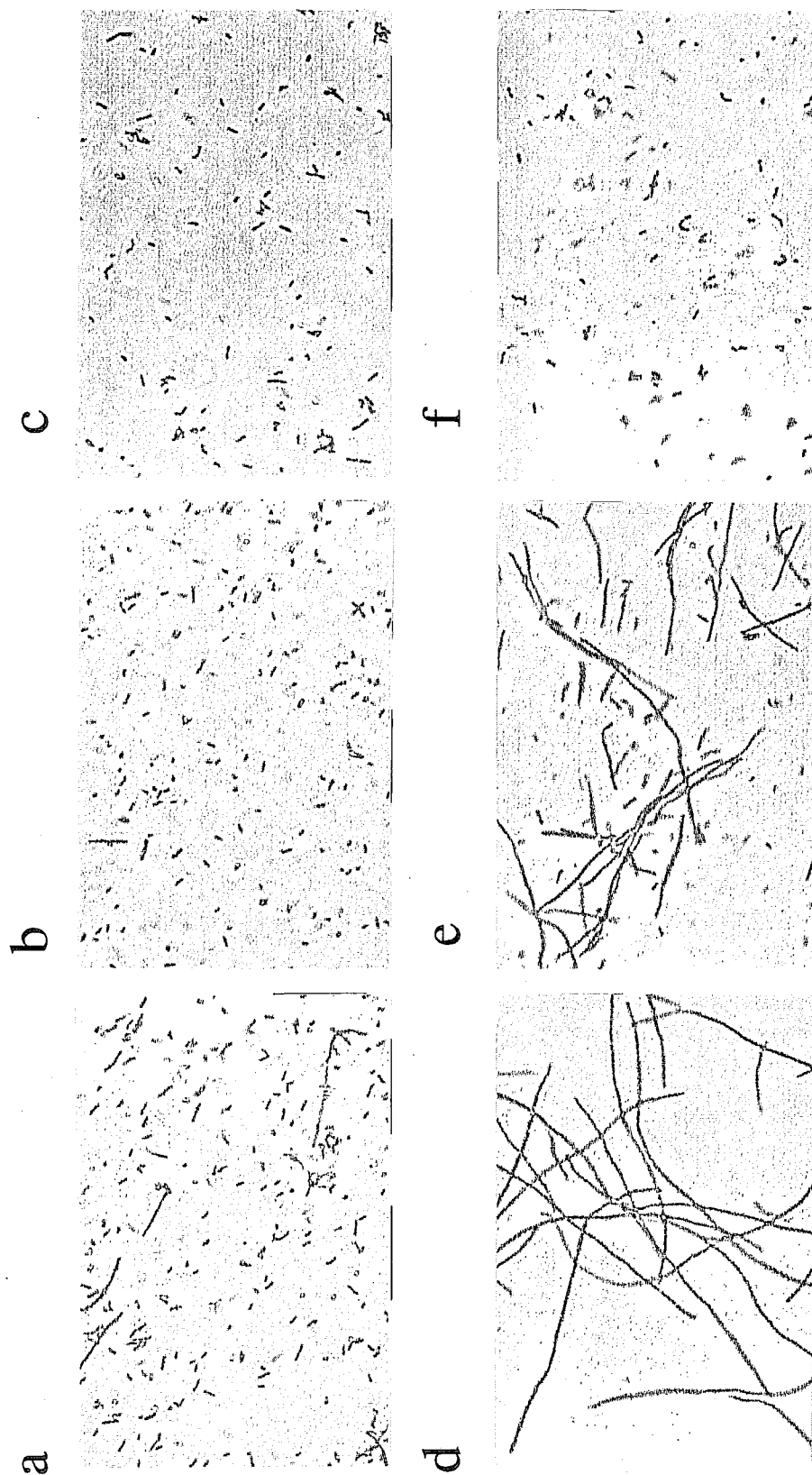


Fig.5-5 Morphological Change of *E. coli*.

Microscopic observation of the morphology of *E. coli* cells is shown. a) and d) JM109 containing pTrc-L, b) and e) JM109 containing pTrc-S, c) and f) JM109 containing vector plasmid, pTrc99A, a) to c), without IPTG, d) to f) induced with 1mM IPTG.

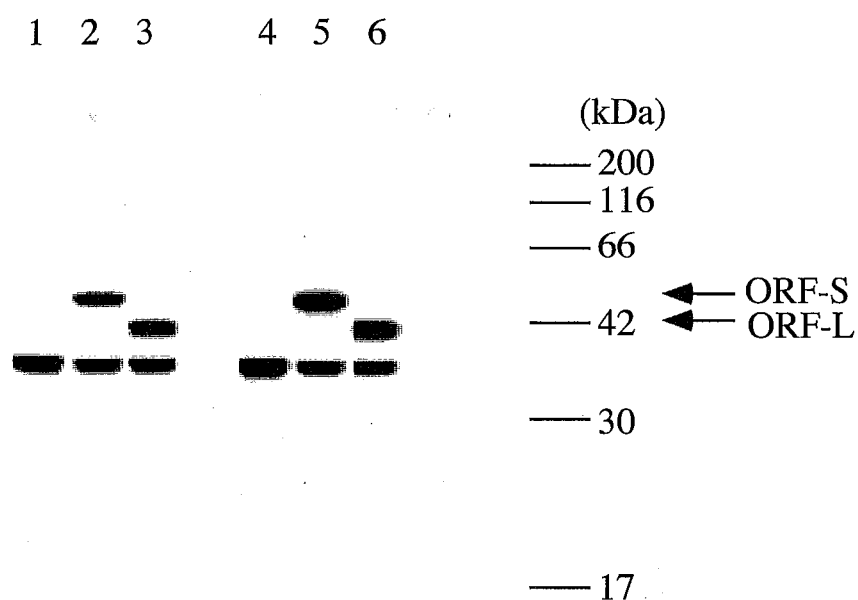


Fig. 5-6 Identification of *ftsZ* products.

lane 1, 4; no plasmid DNA as negative control. In lanes 2 and 6; pTrc99A, in lanes 3 and 7; pTrc-L and lanes 4 and 8; pTrc-S were used as template for *in vitro* protein synthesis assay, respectively. In lanes 2 to 4 and lanes 6 to 8, 1 and 2 mg DNA were used as templates, respectively. Two protein bands, approx. 41 kDa and approx. 47 kDa, which are identical with the molecular mass predicted from ORF-S and ORF-L, respectively, are shown by arrows.

要約

既にクローン化されている *Escherichia coli*、*Rhizobium meliloti* および *Bacillus subtilis* の *ftsZ* 遺伝子の保存領域を基に縮重したオリゴヌクレオチド(degenerate oligonucleotides)プライマーを設計し、*Brevibacterium flavum* MJ233 の染色体を鋳型に増幅した。これによって得られた PCR 産物を *B. flavum* MJ233 より作成したラムドライブラリーとの hybridization に用いた。その結果、4.2 kb の *EcoRI* 断片を得た。この断片には *ftsZ* 相同体が含まれていた。得られた *B. flavum* 由来の *ftsZ* 相同体は 438 アミノ酸からなり、予想される分子量は 46.9 kDa であった。この分子量は *in vitro* protein synthesis assay によって得られた値と一致した。*E. coli*、*R. meliloti*、*Bacillus subtilis* および *Streptomyces coelicolor* との比較から得られた遺伝子はこれらのものと比較的高い相同性を、GTP binding motif と GTP 加水分解領域を有していた。*E. coli* JM109 における *B. flavum ftsZ* 遺伝子の発現実験では、細胞分裂の阻害と細胞の伸長化を引き起こした。この結果は *B. flavum ftsZ* 遺伝子産物が *E. coli ftsZ* 遺伝子産物と競合したことを示すものである。

コリネ型細菌の温度感受性細胞分裂変異株の分離

はじめに

コリネ型細菌におけるグルタミン酸の細胞外への蓄積と細胞分裂との関係を明らかにするためには温度感受性細胞分裂変異株の分離とその解析が不可欠である。各種細菌において細胞分裂のキーとなる *ftsZ* 遺伝子やその変異株が分離され、解析が進められている。*Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* においては細胞分裂過程の温度感受性変異株が分離されている。*E. coli* では制限温度下で細胞分裂が阻害されても細胞の増殖は停止せず、著しく伸長した形態を示す (Lutkenhaus *et al.*, 1980)。また、*B. subtilis* においても同様の現象が確認されている (Callister *et al.*, 1981)。しかし両菌において *ftsZ* 遺伝子は生育に必須な遺伝子であるため破壊株は生存できない。一方 *Streptomyces coelicolor* では *ftsZ* 遺伝子の破壊株が分離されている。この株は孢子形成能を欠失している。しかしながら、隔壁形成が阻止されるため細胞の形態は伸長化し、増殖は停止しない (McCormick *et al.*, 1994)。*E. coli* や *B. subtilis* の温度感受性変異株と同様の現象である。これらの株には変異による形態的特徴を伴うため、その遺伝的性質を容易に判断することができる。しかしながらコリネ型細菌では得られた変異株に際だった差異は認められず、それらを形態的に分離することは困難と考えられる。そこで、前章で示した遺伝子断片によって温度感受性を回復する変異株のスクリーニングをし、その解析を行った。

材料と方法

○供試菌株と生育条件

第二章に表記した *Corynebacterium glutamicum* ATCC31831 より作出した温度感受性変異株を *fts* 変異株のスクリーニングに用いた。各種遺伝子操作は *Escherichia coli* K-12 JM109 を用いこれより抽出したプラスミドを *Escherichia coli* JM110 に導入し、回収したものを *C. glutamicum* の変異株に導入した。Northern hybridization には協和発酵工業株式会社より分譲された *C. glutamicum* KY9714 (lysozyme 感受性株) を用い、対数増殖期の細胞を RNA 抽出に用いた。供試菌株は Lennox (L)-broth (Lennox, 1955) または 1.5 % 寒天を含む L-plate で 30 °C または 37 °C

で培養した。必要に応じ *E. coli* には 20 $\mu\text{g/ml}$ の kanamycin (Km)、20 $\mu\text{g/ml}$ の chloramphenicol (CP) を *C. glutamicum* 変異株には 5 $\mu\text{g/ml}$ の Km を添加した。5 ml L-broth で培養したものを 660 nm の波長光における吸光値を測定することにより生育の確認を行った。

○pNK3 および各種欠失プラスミドによる相補試験

シャトルベクター pC2 (Goyal *et al.*, 1996) および *ftsZ* 遺伝子を含む約 4.2 kb の *EcoRI* 断片 (Kobayashi *et al.*, 1997) より pNK3 を構築した (Fig. 6-1)。また、*E. coli* ベクター pHSG298 および前述の断片より pKFZ8、pKFZ9、pKFZ8K、pKFZ9K、pKFZ8AP を構築した (Fig. 6-5)。JM110 より抽出した pNK3 および欠失プラスミド pKFZ8、pKFZ9、pKFZ8K、pKFZ9K、pKFZ8AP を *C. glutamicum* 温度感受性変異株に導入した。導入方法は第一章と同様の操作で行った。得られたコロニーを生理食塩水に懸濁し 5 mg/ml Km 入り L-plate に塗布し 30 °C または 37 °C で 48 h 培養し、生育の有無から温度感受性を確認した。

○顕微鏡観察

第一章と同様の操作を行った。

○PCR 法

ZC1: 5'-ccgatgaagatgtcaacctcatctt-3'、ZC2: 5'-accgttgcgggctcccatgcggcct-3'、K1: 5'-acatcgacaatgacctcaccgaacaactac-3'、K2: 5'-gtctcctcaatgcgatgacgtgcaccagca-3'、U1: 5'-gtaaaacgacggccagt-3'、R1: 5'-caggaaacagctatgac-3'、Q1: 5'-gacgtaagtgaacaaggcaggactagc-3'、Q2: 5'-acgggtgaaccggaactaccagctact-3' の 8 種類のプライマーを用いた。断片の増幅には上述のプライマーと LA PCR kit Ver. 2 (宝酒造社製)、プログラマブルサーマルコントローラー PTC-150 (MJ Research, Inc.) を用いた。増幅行程は 94 °C 1 min の後、98 °C 20 sec.、50 °C 30 sec.、62 °C 3 min. を 29 サイクル行い最後に 70 °C 10 min. の処理で行った。

○塩基配列の決定

Brevibacterium flavum MJ233 より分離した *ftsZ* 遺伝子(Kobayashi *et al.*, 1997) の塩基配列を基に設計した ZC1 および ZC2 を用い PCR 法にて *KpnI-SphI* 断片を増幅した。増幅した DNA 断片を *E. coli* ベクター pHSG398 にクローニングし複数のクローンについて dideoxy 法(Sanger *et al.*, 1977)により塩基配列を決定した。

○Northern hybridization

コリネ型細菌は2層からなる細胞壁を有し、lysozyme に対しても耐性を持っており細胞破碎や核酸の抽出が極めて困難である。そこで lysozyme 感受性株 *C. glutamicum* KY9714 を用い、対数増殖期中期の細胞を回収し TE buffer (10 mM-Tris、1mM-EDTA)で洗浄した後 lysozyme (500 mg/ml)を添加し、等量の Phenol/Chloroform (1:1)を加え遠心後の上清を RNA サンプルとした。プローブには K1、K2 および Q1、Q2 によって増幅された DNA 断片を蛍光ラベルしたものをを用いた。プローブの蛍光ラベルならびに Northern hybridization は Fluorescein Gene Image (Amersham Life Science)のプロトコールに従った。

結果

○pNK3 による相補試験

シャトルベクター pC2 と *ftsZ* 遺伝子を含む 4.2 kb の *EcoRI* 断片からなる pNK3 (Fig. 6-1)を JM110 より抽出し *C. glutamicum* 温度感受性変異株に導入した。得られた形質転換体の温度感受性を調べた結果、pNK3 によって温度感受性を回復する株を1株得、K105 と名付けた。次に、Km 耐性能を持つ K105 の形質転換体からの pNK3 の抽出を試みたが得られなかった。次に、ベクター上の塩基配列および *ftsZ* 遺伝子の塩基配列を基に設計したプライマー U1、R1 および K1、K2 を用い PCR

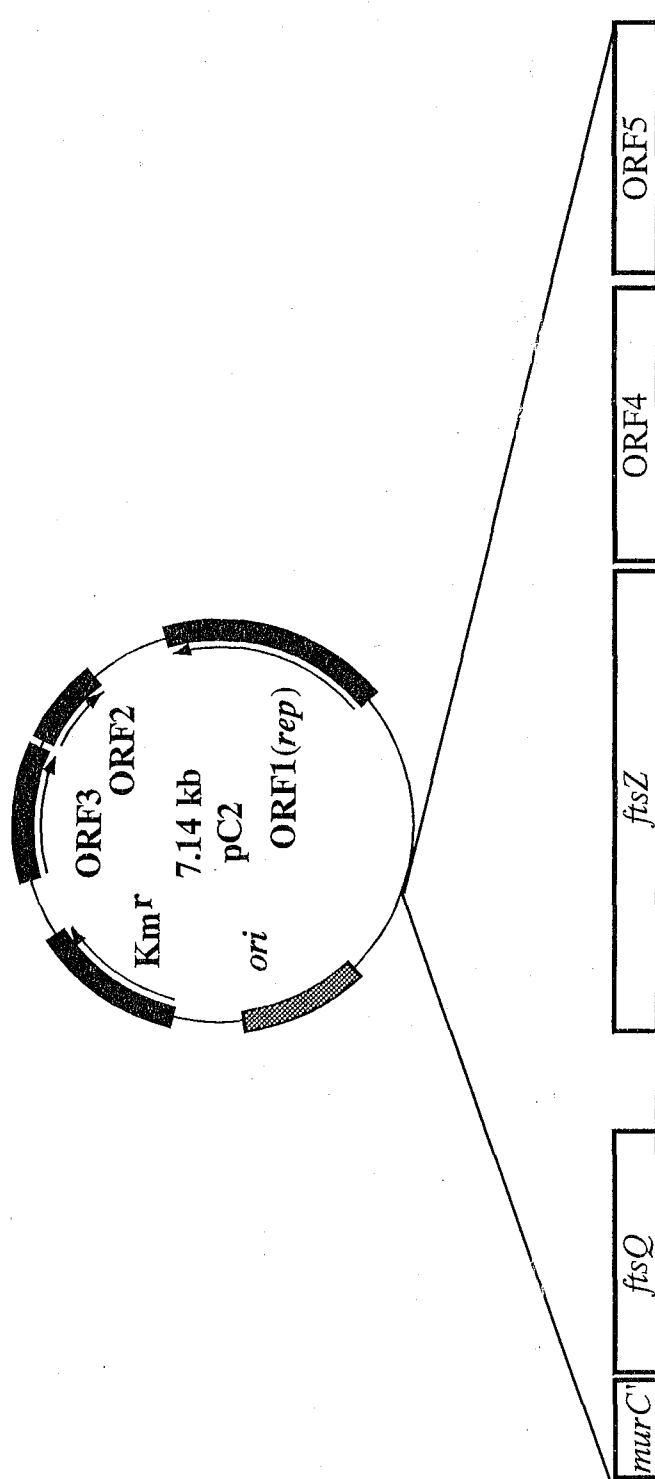


Fig. 6-1 Construction of pNK3.

pNK3 was constructed from a shuttle vector pC2 (Goyal et al., 1996) and a 4.2 kb *EcoRI* fragment which was cloned from *Brevibacterium flavum* MJ235 (Kobayashi et al., 1997). An *EcoRI* fragment was inserted into *EcoRI* site in pC2.

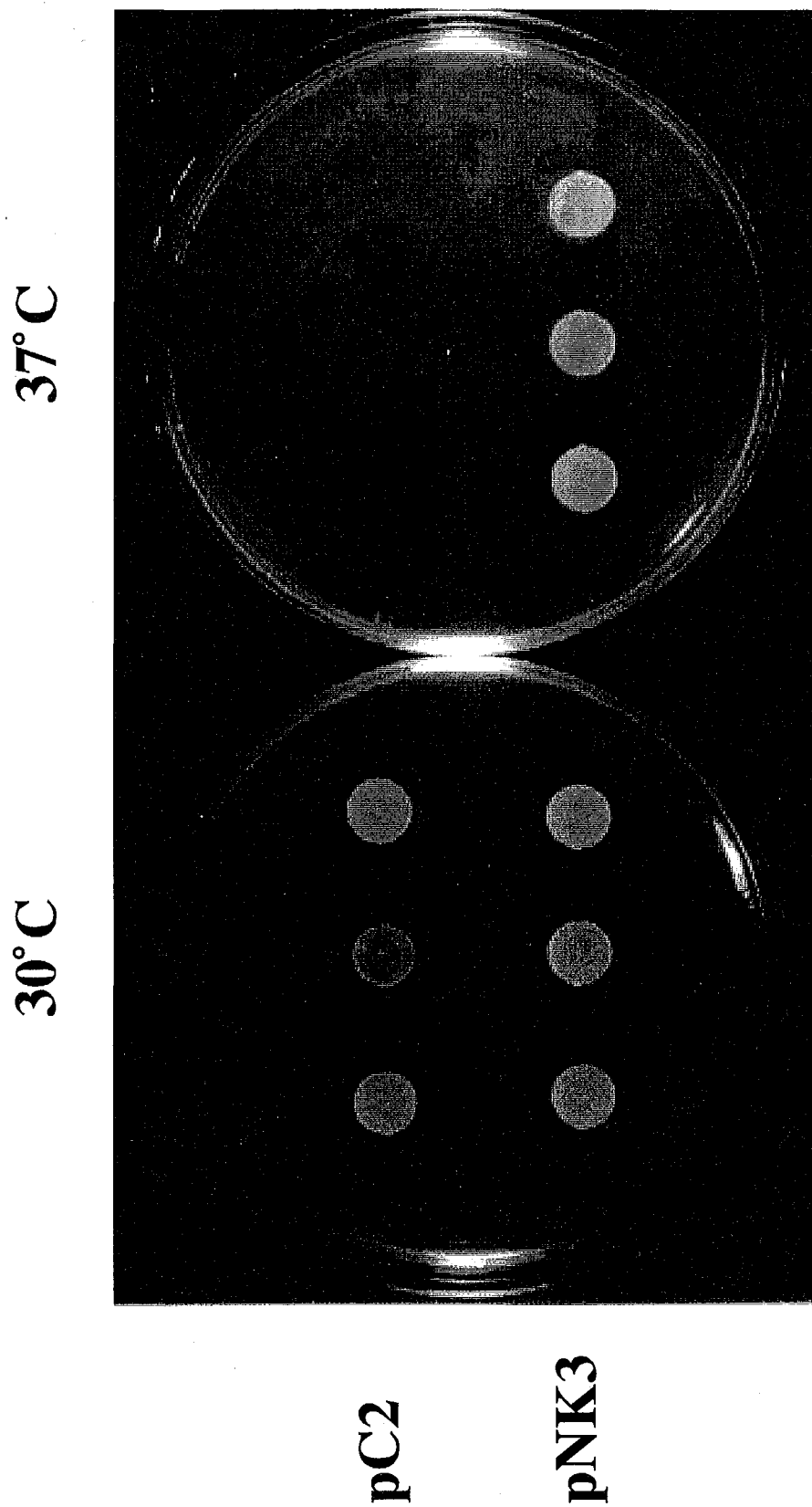


Fig. 6-2 Complementation of *ts* mutant K105 by pNK3.
Complementation test was performed

法にて K105 の形質転換体の染色体から増幅した。その結果 K1-U1、K2-R1 からそれぞれ 7 kb および 2.3 kb の断片が増幅され(Fig. 6-3)、pNK3 と染色体との間で相同組換えが起こったことが確認された(Fig. 6-4)。

○各種欠失断片による相補試験

K105 は pNK3 により温度感受性が相補されることがわかった。しかしながら、4Kb の挿入断片には上流から *murC* 遺伝子の C 末端領域、*ftsQ*、*ftsZ*、2 つの ORF が含まれており、相補の原因が不明である。そこで各種欠失断片を構築しこれらによる相補試験を行った。また pNK3 同様各種プラスミドについても *C. glutamicum* K105 細胞内でプラスミドとして存在することが困難と考えられるので、*E. coli* ベクター pHSG298 を用いて欠失断片を構築し、相同組換えによる相補試験に用いた。その結果、pKFZ8K を除くすべてのプラスミドで相補した。相補したプラスミドのうち、pKFZ9K は *ftsZ* の *KpnI* サイトより C 末端領域側とその下流の ORF4、5 をまた、pKFZ8AP は *ftsQ* の C 末端領域、*ftsZ* の全配列、ORF4 の N 末端領域を含んでいる(Fig. 6-5)。特に pKFZ9K では得られた 50 個の形質転換体のうち 7 クローンが温度感受性を回復した。温度感受性の回復が全配列を持つ ORF4、5 に起因する場合、形質転換体の染色体上には少なくとも一つは変異のない健全な遺伝子が存在することになり、得られた全ての形質転換体が相補される。しかし、部分配列の *ftsZ* 遺伝子に起因する場合、組換え点に依存して遺伝子内の変異の有無が決まる。これらの結果から、温度感受性の回復は *ftsZ* 遺伝子の C 末端領域に起因すると考えられる。

○K105 の変異点の決定

相補試験の結果から変異点は *ftsZ* 遺伝子の *KpnI* サイトから C 末端領域に存在することが推察された。そこで、この *KpnI* から ORF4 の中にある *SphI* までをプライマー ZC1、ZC2 を用い PCR 法にて増幅し、得られた複数のクロンの塩基配列を dideoxy 法にて決定した。その結果、K105 では *ftsZ* 遺伝子の 952 番目の G

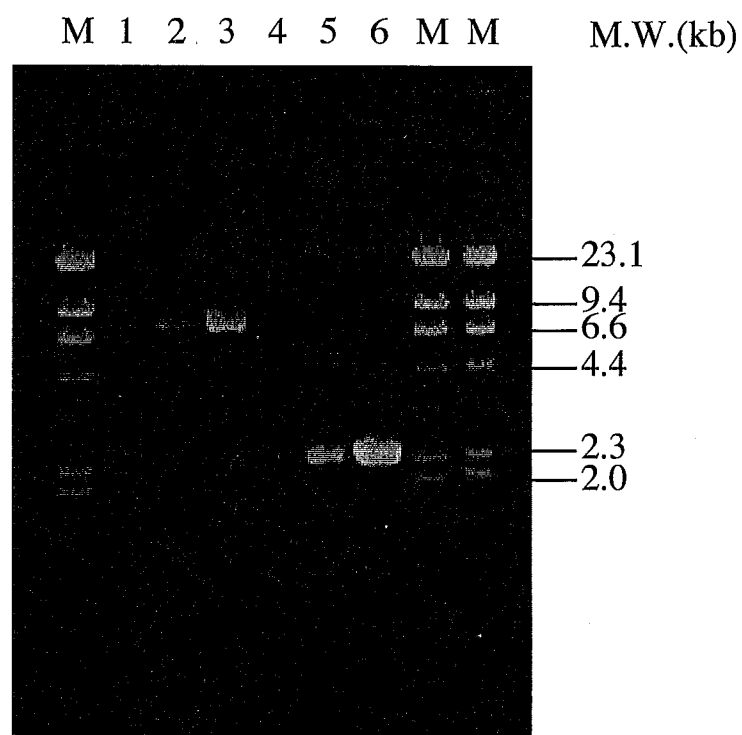


Fig.6-3 Photographs of gel electrophoreisis for detection of the DNA frsgments containing *ftsZ* region.

DNA fragments in photograph were amplified by PCR from K105 chromosomal DNA (Lane 1, 4),K105 transformed with pNK3 (Lane 2, 5) and pNK3 (Lane 3, 6)and by using K1, U1 (Lane 1, 2, 3) and K2, R1(Lane 4, 5, 6) as primer.

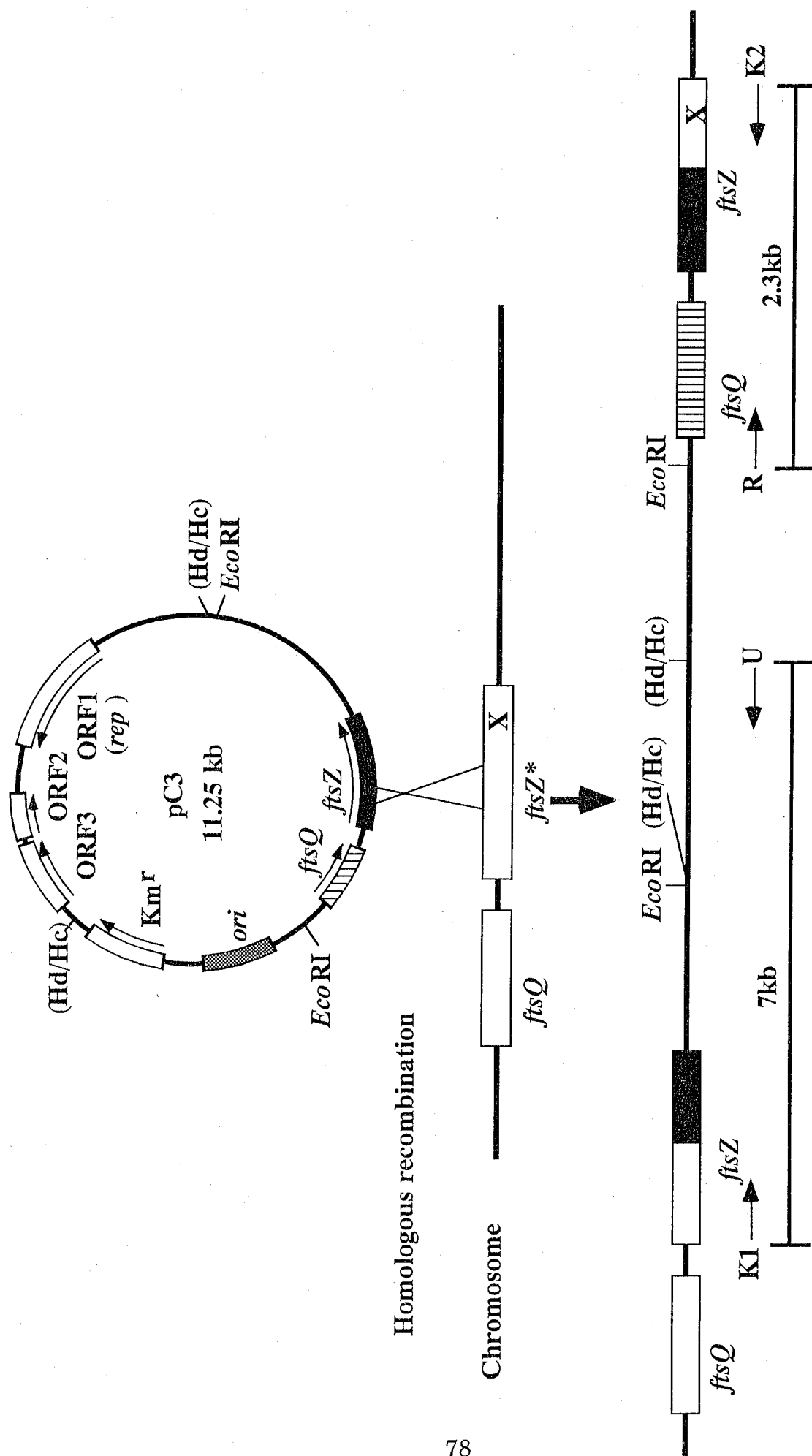


Fig. 6-4 Hypothetical model of integrational complementation by pNK3 in K105.

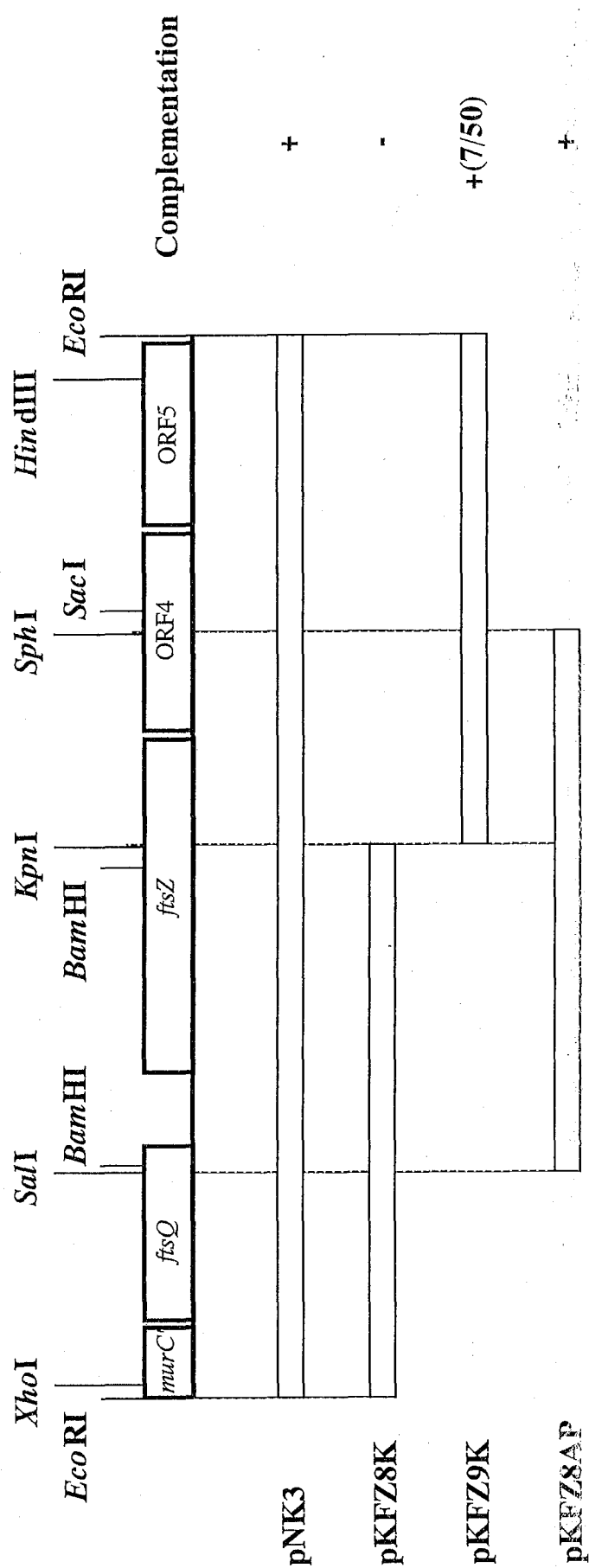


Fig. 6-5 Complementation tests of several deletion plasmids.
pC2 was used for pNK3 and pHSG298 was used for other plasmids as vector.

が欠失していることが確認された。これに伴いそれ以降の配列でフレームシフトが起こっていた (Fig. 6-6)。これにより予想されるアミノ酸配列が変化した。予想されるアミノ酸から算出した分子量は野生型が 46861 で変異型が 45864 であった。さらに本遺伝子の特徴でもある C 末端領域の親水性配列が比較的疎水性に富む配列に変わっていた。(Fig. 6-7)。

○K105 の生育特性

野生株では 30 °C、37 °C で同様の生育特性を示した。一方、K105 は 30 °C から 37 °C にシフトした後 3 h は同様の濁度上昇を示したが、それ以降濁度の上昇は停止した(Fig. 6-8)。次に、Hiraga らの方法を用い温度感受性変異株 K105 の形態を観察した。*C. glutamicum* ATCC31831 は 30 °C から 37 °C で良好な生育を示す。また 20 °C でも生育するが遅延傾向にある。野生株ではこのすべての温度において形態的变化は認められない。K105 では、許容温度の 30 °C において膨らみが認められる。細胞長は一倍から二倍長であった。制限温度の 37 °C においても膨らみが確認された。特にその傾向は末端部分で顕著で、ダンベル状の形態を示した(Fig. 6-9)。

○*C. glutamicum* における *ftsQ* および *ftsZ* の転写制御

スクリーニングの結果得られた温度感受性細胞分裂変異株 K105 は相補試験および塩基配列から *ftsZ* 変異株であることが判明した。しかしながら、制限温度におけるその形態は *E. coli* や *B. subtilis* における *ftsZ* 変異株とはきわめて異なるものであった。*E. coli* では *ftsQ*、*ftsA*、*ftsZ* の 3 つの遺伝子が(Yi *et al.*, 1985a)、*B. subtilis* では *ftsA*、*ftsZ* の 2 つの遺伝子がそれぞれオペロンを形成しており(Gonzy-Treboul *et al.*, 1992)、同調的に制御されている。*C. glutamicum* では *ftsZ* 変異株においても *E. coli* や *B. subtilis* とは異なる細胞形態を示しており、*ftsQ* および *ftsZ* 遺伝子の制御にも、特異性の存在が予想される。そこで *C. glutamicum* KY9714 より RNA を抽出し Northern hybridization を行った。その結果、K1、K2 によって作成した *ftsZ*

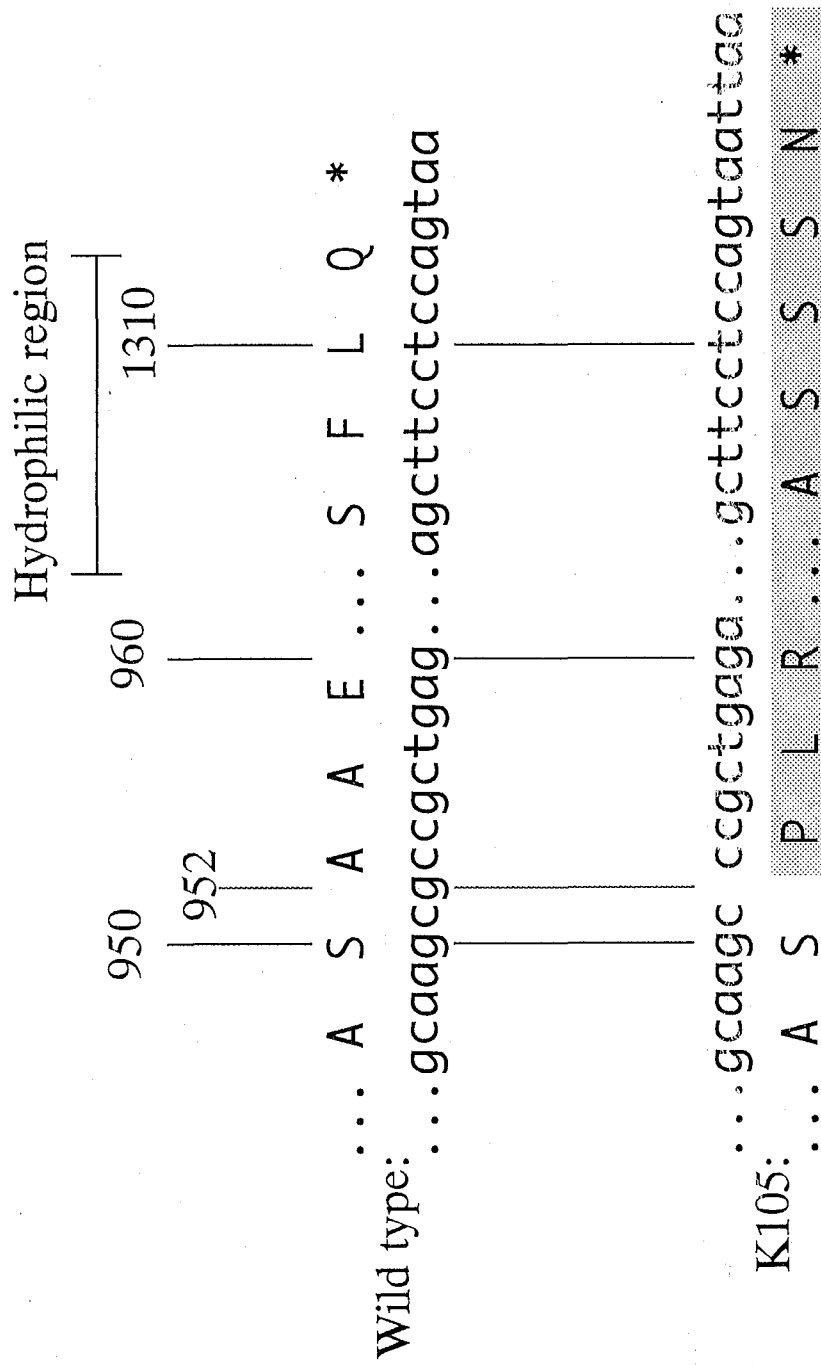


Fig. 6-6 Determination of mutation point in *ftsZ* gene of K105.

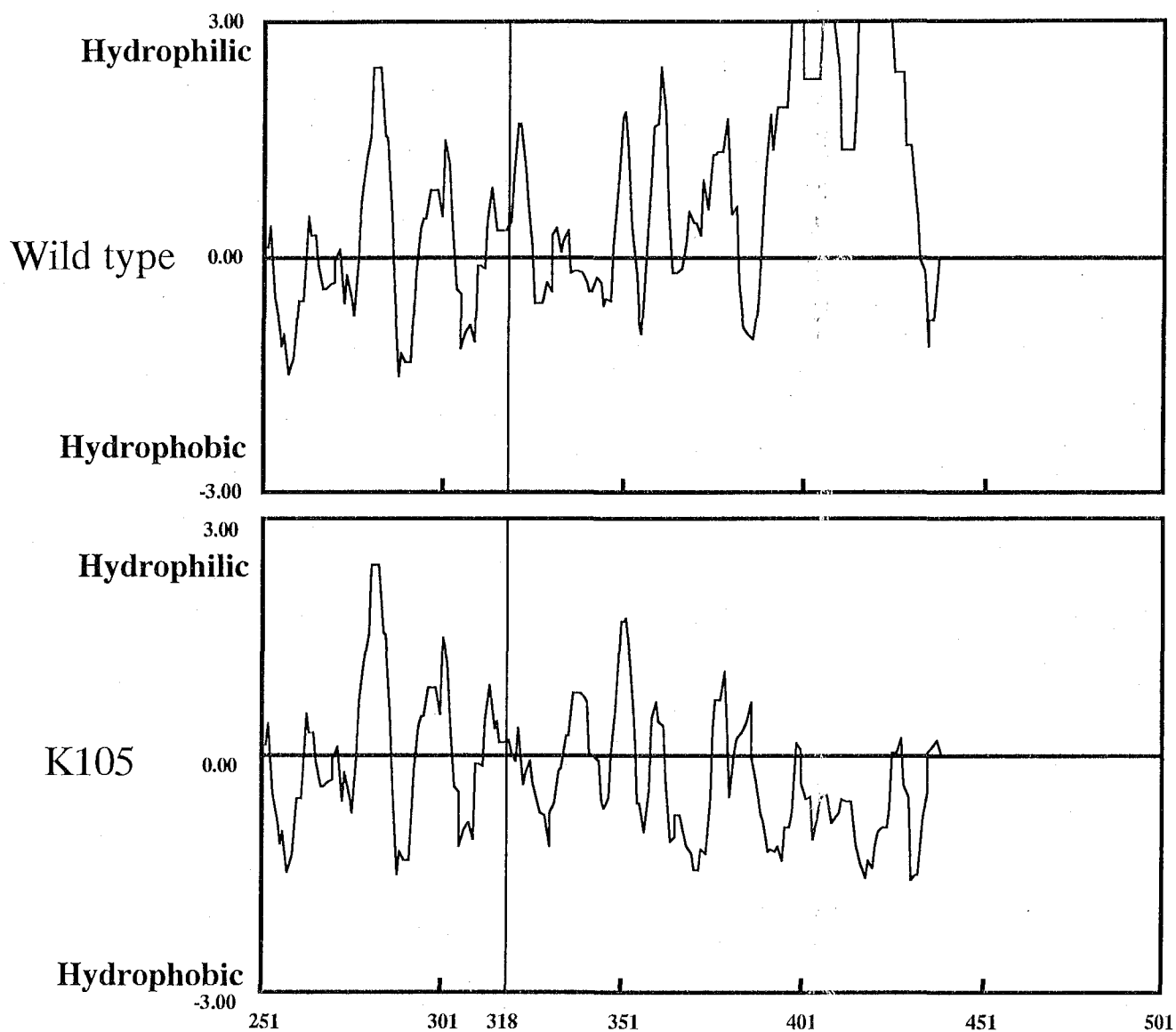


Fig. 6-7 Comparison of hydropathy profiles of wild type and mutant type FtsZ proteins.

The abscissa is divided into increments of 50 amino acids. The line at 318 indicates mutation point.

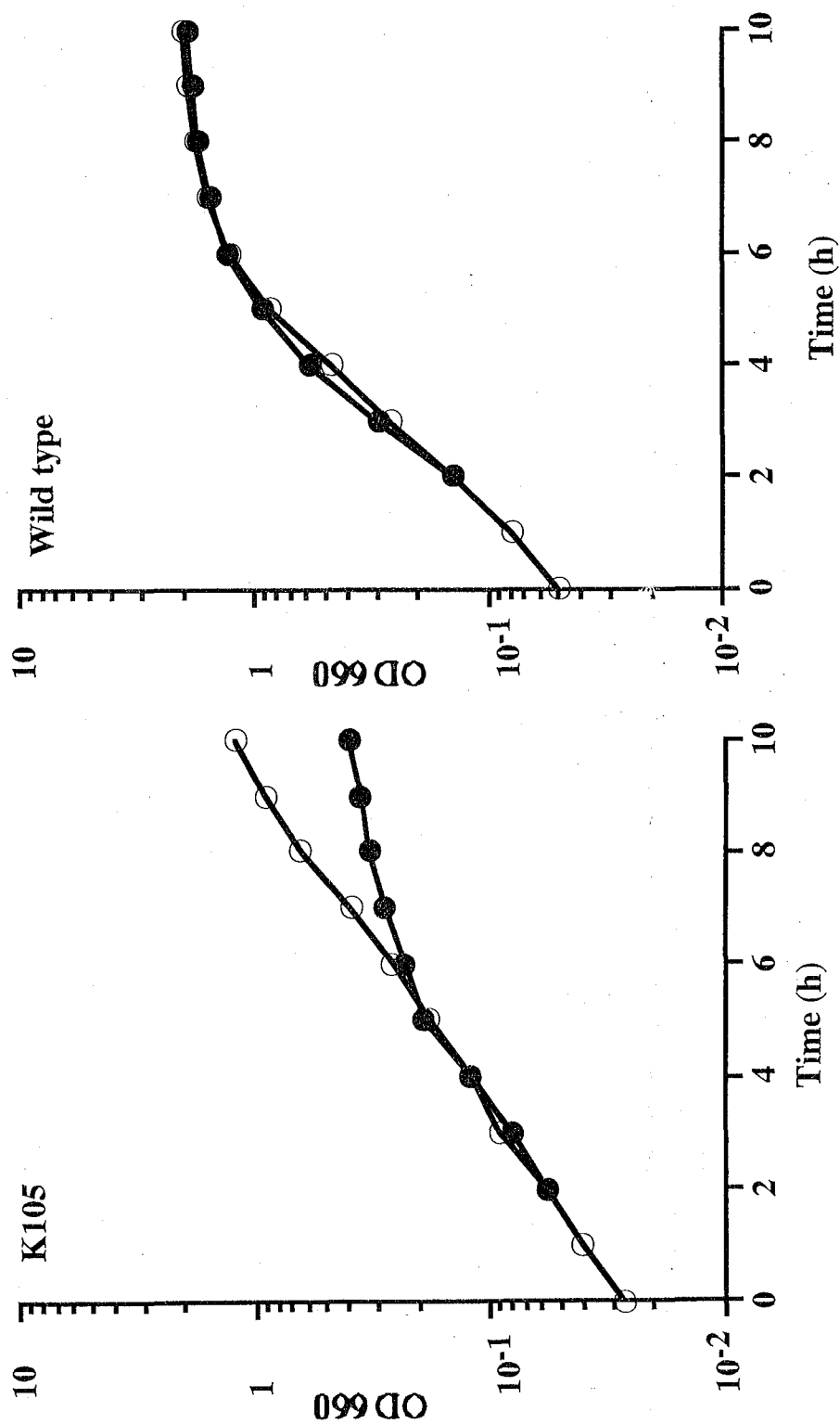


Fig. 6-8 Growth properties of K105 and the parent strain ATCC31831.

Growth property was characterized by measuring cell mass. Cell mass was determined by measuring OD 660 (30 °C; open circles and 37 °C; closed circles). Cells were grown in L broth at 30 °C for 2 h and a half of the cultures were shifted to 37 °C.

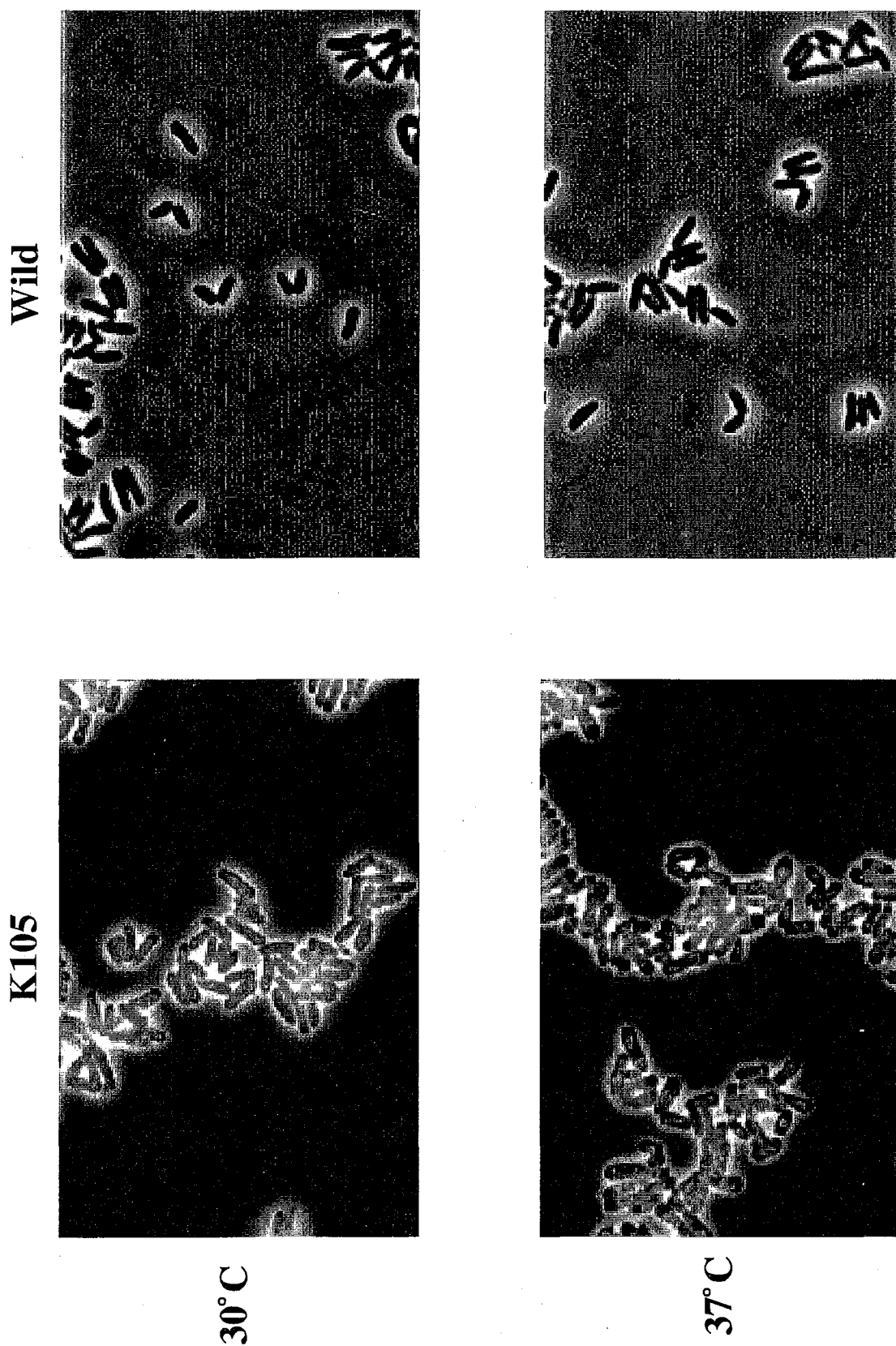


Fig. 6-9 Photomicrographs of *C. glutamicum* K105 and *C. glutamicum* ATCC31831. Cells were grown in L'broth at 30°C for 2 h and shifted to 37°C and observed by fluo-phasecontrast microscopy.

用のプローブで特異的なバンドが検出され、そのサイズは 1.6 kb であった。一方 Q1、Q2 で作成した *ftsQ* 用のプローブでは特異的なバンドは検出されなかった(Fig. 6-10)。

考察

コリネ型細菌 *C. glutamicum* ATCC31831 を NTG により変異処理をし、温度感受性細胞分裂変異株約 150 株を得た。しかし、*E. coli* や *B. subtilis* における *fts* 変異株のような伸長した形態を示す変異株は得られなかった(第三章)。変異株の形態による特定遺伝子との関連づけは困難と考えられたことから、すでにクローニングされているコリネ型細菌 *Brevibacterium flavum* MJ233 の *ftsQ* および *ftsZ* 遺伝子を含む断片(Kobayashi *et al.*, 1997)によって変異が相補される株をスクリーニングした。その結果制限温度である 37 °C において温度感受性を回復する株 1 株をみだし、K105 と名付けた。次に、ベクター上の配列と染色体上の配列から設計したプライマーによって PCR を行った結果、相同組換えによって相補されたことを確認した(Fig. 6-3、Fig. 6-4)。*E. coli* において、*ftsZ* 遺伝子の過剰発現は細胞死を導くことが知られている(Dewar *et al.*, 1992)。本実験に用いたベクターはコピー数が多いため、プラスミドでの存在は *E. coli* における過剰発現と同様の状態であったと考えられる。そのため、染色体上に組み込まれたクローンのみが必要量の FtsZ を過不足なく供給され、形質転換体として得られたと推定される。

次に、変異点を特定するため各種欠失断片による相補試験を行った。その結果、*ftsZ* 遺伝子の C 末端領域の配列により K105 が温度感受性を回復することを確認した(Fig. 6-5)。次に、この領域の塩基配列を決定した結果、温度感受性変異株 K105 では *ftsZ* 遺伝子の 952 番目の G が欠失していた(Fig. 6-6)。これによりフレームシフトが起こり、これ以降にコードされるアミノ酸が変化した。本遺伝子の特徴でもある C 末端領域の親水性ドメインが変化し、むしろ疎水性に富むアミノ酸配列に変化していた(Fig. 6-7)。この変化に伴い生産されるタンパク質はその熱安定性

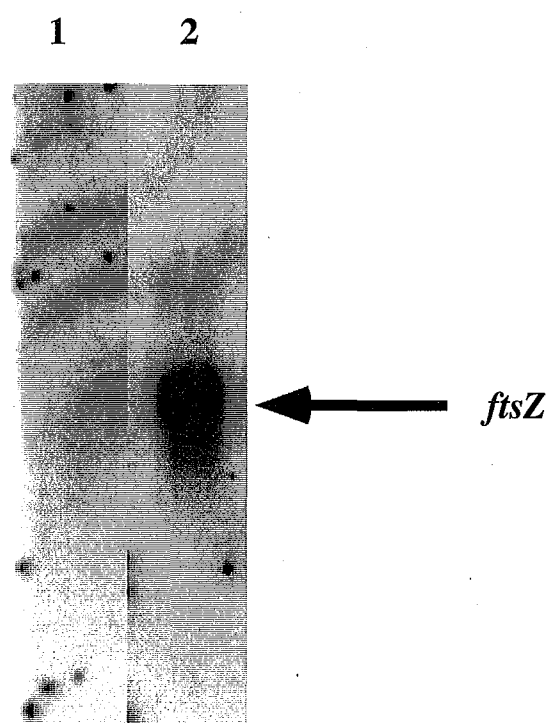


Fig. 6-10 Northern hybridization.

Cells were grown in L broth at 30°C till mid-log phase and harvested. RNA samples were prepared from harvested cells and used for Northern hybridization. The fluorescent labeled probes were used for detection of *ftsQ* (Lane 1) and *ftsZ* (Lane2)

を低下させ、制限温度における K105 の温度感受性へと繋がったと考えられる。

K105 の生育特性は 37°C にシフトアップして 3 時間は 30°C と同様であったがその後生育遅延が認められた。制限温度である 37°C における形態は許容温度におけるものに比べ膨らみがありダンベル様の形状を示した。このことからシフトアップ後 3 時間の同調は分裂によるものではなく、この形態変化に起因するものと考えられる。*E. coli* における *ftsZ* 変異株は制限温度である 42 °C で著しく伸長した細胞形態を示し、顕著な生育遅延は認められない。このような事例と比較すると極めて特徴的な性質を持つことがわかった。

コリネ型細菌においては、従来考えられてきた *fts* 変異株の極端な細胞伸長現象は当てはまらず極めて特異な性質を持つことがわかった。*ftsZ* 遺伝子は細胞分裂にとって欠くことのできない遺伝子でありその重要性は *E. coli* において証明されている(Dai *et al.*, 1991)。また他の細菌においても *S. coelicolor* の特殊な例外を除き、欠失株が存在しないことから裏付けられる。さらにその発現も周辺の遺伝子とオペロンを形成し同調的に制御されている(Yi *et al.*, 1985b, Gonzy-Treboul *et al.*, 1992)。そこで *C. glutamicum* における *ftsZ* 遺伝子の制御機構を知るため Northern hybridization による解析を行った。その結果 *ftsZ* を基に作成したプローブでは 1.6 kb に特異なバンドが確認された。*ftsZ* 遺伝子は 1.3 kb からなる塩基配列を持つ。その近傍の配列には上流に、*ftsQ* および非コーディング領域がそれぞれ 0.6 kb、0.3 kb ある。また下流には 0.8 kb の ORF4 がある。このことから、*ftsZ* 遺伝子は前後の遺伝子とオペロンは形成せずに、すぐ上流の非コーディング領域から転写されていると考えられる。一方 *ftsQ* を基に作成したプローブに対しては特異なバンドが検出されなかった。*E. coli* では、*ftsZ* 遺伝子には自己のプロモーターも存在しており、その転写量は *ftsQ* および *ftsA* からの転写量と同等および 3 倍である。(Flardh *et al.*, 1997)。本実験の結果から、コリネ型細菌においては、*ftsQ* 遺伝子よりもはるかに強力なプロモーターが *ftsZ* 遺伝子に存在することが示唆された。

以上のことから Fig. 6-11 に示す図を考案した。*E. coli* の *ftsZ* 変異株では細胞分裂が阻害されると隔壁が形成されない、しかし細胞増殖は継続するため細胞が

伸長する。一方、コリネ型細菌では細胞分裂が阻害されると細胞の増殖も停止する。その結果、細胞の伸長も阻止され、細胞の長さは約2倍までしか伸長しない。これと同様の現象は阻害剤存在下においても確認された(第三章)。これはコリネ型細菌において、細胞分裂と細胞増殖との間に密接な関係が存在することを示唆するものである。

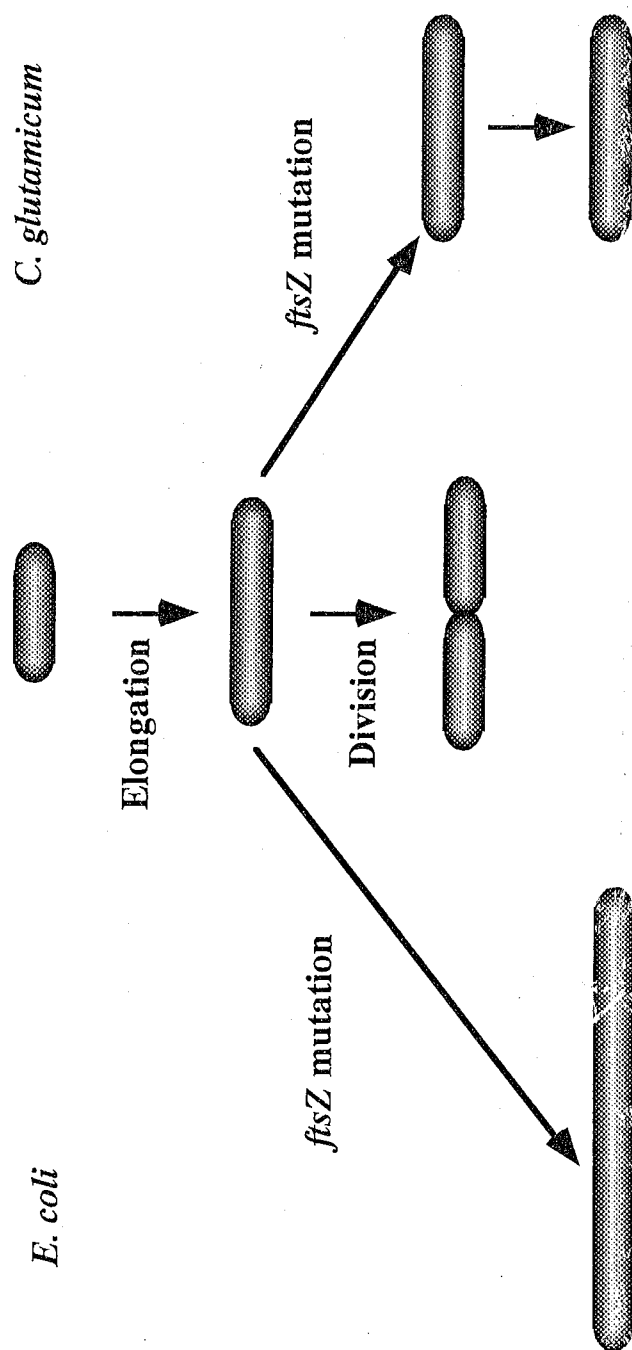


Fig. 6-11 Hypothetical model of the division fashion in *C. glutamicum* and *E. coli*.

要約

グルタミン酸産生の誘導が細胞分裂の阻害によって引き起こされているのかどうかを検証するために、前章で報告した遺伝子断片によって温度感受性を失う変異株のスクリーニングを行った。その結果、相補される一株が得られ、K105と名付けた。この株は *ftsZ* 遺伝子の 952 番目の G が欠失しており、それ以降のアミノ酸配列が野生株のものと異なっていた。特に本遺伝子の特徴でもある親水性に富む C 末端領域が無くなりむしろ疎水性配列に変わっていた。次に本菌株の生育特性を調べた。制限温度である 37℃において、生育の遅延が確認された。またこの時の細胞形態は末端が膨らんだダンベル様であり、正常細胞と同じかまたは 2 倍程度に伸長していた。この結果は *Escherichia coli* の *fts* 変異株が制限温度で示す伸長化した細胞形態とは極めて異なるものであった。この結果は阻害剤による効果に類似していた。また、Northern hybridization の結果 *ftsZ* 遺伝子は周辺の遺伝子とオペロンを形成しておらず、独自のプロモーターで発現していることを見いだした。この点についても他の細菌との相違が認められた。これらの結果は、コリネ型細菌における細胞増殖と細胞分裂における密接な共役機構の存在を強く示唆するものであった。

総括

本研究では、コリネ型細菌における細胞複製と細胞増殖の共役機構について研究を行った。非病原性コリネ型細菌の研究は1957年グルタミン酸を生産する細菌 *Micrococcus glutamicus* の分離に始まった。その後の研究は我が国の輝かしいアミノ酸工業の発展を導くものでもあった。これらの研究には変異処理による有用菌株の育種、生合成系の改良、生育条件の検討改良があった。その中で biotin 制限や penicillin の添加といった細胞表層に影響を与える方法の発見があった。近年 biotin 欠乏によるグルタミン酸生産のメカニズムの解明が該当遺伝子のクローニング等により進められてきている。しかしながら penicillin による効果の解析は未解明のままである。penicillin は細菌の細胞壁成分 Peptidoglycan を合成する Penicillin-Binding Proteins (PBPs) の阻害剤である。また、グルタミン酸の産生は細胞の増殖が停止したときに起こる。このことから、グルタミン酸生産と細胞複製に密接な関係があると考えられる。そのため、複製のメカニズム解明は学術的興味と発酵生産の発展に寄与する重要な研究と考えた。以下に本論文のまとめを示した。

シャトルベクター pC2 の機能解析(第二章)

遺伝学的研究に必要なツールの開発としてシャトルベクターの開発研究を行った。細菌における遺伝学的研究は *E. coli* におけるものが圧倒的な割合を占める。そこでこの *E. coli* の遺伝学的知見を有効に利用するため *E. coli* とコリネ型細菌との間で自由自在に機能するシャトルベクターの存在は重要な意味を持つ。そこで *E. coli* 用のベクターである pHSG298 と *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 の潜在プラスミド pBL1 を組み合わせた pC2 を構築した。しかしながら、このプラスミドは *E. coli* の細胞内で阻害的に働く ORF (ORF3) を含んでいた。そこでこれを除去し、有用性を高めた pDG8 を構築した。

コリネ型細菌の細胞分裂機構の解析(第三章)

細胞分裂の特徴を把握するため *E. coli* において遺伝学的研究を進める上で

た。NTG により変異処理を施した *C. glutamicum* ATCC31831 より 150 の変異株を得た。解析の第一歩として形態を観察した結果、*E. coli* や *Bacillus subtilis* で容易に見受けられる伸長化した細胞形態が認められなかった。次に Peptidoglycan 合成阻害剤である cephalixin (CEX)、DNA 合成阻害剤である sparfloxacin (SPFX) による影響を調べた。*E. coli* ではこれらの薬剤の添加に伴い細胞分裂が阻害される。しかし細胞の成長は阻害されないため伸長化した細胞形態を示す。この形態は制限温度下における *fts* 変異株の形態と非常によく似ていた。コリネ型細菌について生育及び形態を観察した結果、驚くべきことに CEX や SPFX を添加すると分裂とともに増殖も停止した。さらにこのときの形態は温度感受性変異株の多くが、制限温度下で示す典型的な僅かに膨らみのあるもので細胞長も約 2 倍と高い類似性を示した。このことから、コリネ型細菌は *E. coli* や *Bacillus subtilis* で得られた知見とは異なる様式で細胞分裂が制御されていると考えた。

コリネ型細菌における Penicillin-Binding Proteins (PBPs) とグルタミン酸生産の関係 (第四章)

penicillin 効果の生化学的、生理学的解析を行った。コリネ型細菌を用いたグルタミン酸の発酵生産において、細胞壁合成阻害剤の penicillin (PC G) を加えることで生産性を向上させる penicillin 効果が知られている。そこでまず penicillin の標的である Penicillin-Binding Proteins を 4 種類のコリネ型細菌より検出した。その結果グルタミン酸生産能を持つコリネ型細菌からは 3 種類の PBPs が検出され、分子量の大きい順に PBP-1、PBP-2、PBP-3 と名付けた。バリン生産菌やアミノ酸生産能を持たない菌では異なる PBPs 組成が示された。次に *C. glutamicum* ATCC31831 を用いさらなる解析を行った。*E. coli* においては PC G の誘導体である mecillinam (MPC) や cephalixin (CEX) が特異的に異なる PBPs に結合しその影響は形態的にも反映される。そこで同様の手法で *C. glutamicum* ATCC31831 について解析を行った。その結果 PC G は PBP-2 に、また MPC、CEX は PBP-3 に高い親和性を示した。またこれらの薬剤による形態への影響はほとんど認められなかった。次に 3 薬剤によ

たこれらの薬剤による形態への影響はほとんど認められなかった。次に3薬剤によるグルタミン酸の細胞外への蓄積を調べた。PCGではMICの10倍量でまたMPC、CEXではMICと同じ濃度で著量のグルタミン酸を蓄積した。またこの濃度はPBP-3が各薬剤と高い親和性を示す濃度であった。これらの結果から、グルタミン酸の産生はPBP-3がキーになっていると考えた。

ftsZ 遺伝子の分離と解析(第五章)

以上のことからグルタミン酸生産と細胞分裂には密接な関連が示唆された。常套手段として細胞分裂変異株を用いた検証が考えられるが、前述の通り *E. coli* や *Bacillus subtilis* と異なり変異株を形態的に特定の遺伝子由来の細胞分裂変異株として識別することは困難である。そこで細胞分裂遺伝子の一つ *ftsZ* のクローニングを行い、これにより相補される変異株のスクリーニングを行った。*ftsZ* 遺伝子は *E. coli*、*Bacillus subtilis*、*R. meliloti* および *S. coelicolor* においてクローニングされている。これらの配列には保存性の高い領域が含まれている。そこで、これらの配列を基に縮重したオリゴヌクレオチドプライマーを合成し *Brevibacterium flavum* MJ235 の染色体 DNA を鋳型に増幅断片を得た。次にこれをプローブとして hybridization を行い、*E. coli* の *ftsZ* 遺伝子と 45.3 % の相同性を示す配列を含んだ 4.2 kb の断片を得た。この塩基配列から予想されるアミノ酸から算出した分子量は、*in vitro* assay によって得られた値に一致した。本遺伝子による *E. coli* の *ftsZ* 変異株の相補は確認できなかった。しかしながら *E. coli* JM109 において IPTG による誘導発現を行ったところ細胞を伸長化させた。*E. coli* において FtsZ を過剰発現させた際、機能的に下流に位置するタンパク質が不足し分裂が阻害される。今回の現象も *B. flavum* MJ233 由来の遺伝子産物が過剰発現の際と同様に機能したと考えられる。これらのことから得られた断片を *B. flavum* MJ233 の *ftsZ* 遺伝子と断定した。また得られた断片には Peptidoglycan の前駆体を合成する *murC* 遺伝子の C 末端領域 *ftsQ* 遺伝子に相同な領域のほか二つの orf が含まれていた。*E. coli* や *Bacillus subtilis* において細胞分裂に関わる遺伝子群は染色体上にいくつかのクラスターをなして存

在している。本配列においてもこれらの遺伝子が少なくとも三つ並んで存在することが示唆された。

ftsZ 変異株の分離と解析(第六章)

この断片を用い変異株のスクリーニングを行い、相補される株 K105 を得た。この株は *ftsZ* 遺伝子の 952 番目の G が欠失しておりそれ以降のコドンが変化し、本遺伝子産物の特徴でもある親水性の C 末端領域が疎水性配列に変わっていることを見出した。K105 の形態的特徴は前述の薬剤処理によって導かれたものとよく似ていた。また Northern hybridization の結果からコリネ型細菌においては *ftsZ* 遺伝子が他の遺伝子とオペロンを形成することはなく単独に独自のプロモーターで発現していることを確認した。この点についても既知の細菌における知見と異なるものであった。さらに、細胞増殖と細胞分裂との間に共役機構の存在が示唆された。

細胞の複製は増殖と分裂の二つのステップからなる。これを繰り返し世代交代を行う。本研究に用いたコリネ型細菌はグルタミン酸をはじめとする一次代謝産物を細胞外に蓄積する特徴を持つ。またこの現象は正常な増殖過程では起こらず、増殖が停止したときにのみ起こる。*E. coli* や *Bacillus subtilis*、*S. coelicolor* においては阻害剤の添加や変異により細胞分裂を止めることができる。しかし、隔壁の合成が阻害されるだけで細胞は伸長し増殖は止まらない。しかしコリネ型細菌では分裂を阻害する薬剤や遺伝子の変異により分裂が阻害され、さらに細胞の増殖も停止する。コリネ型細菌には細胞分裂を止めると細胞増殖も止める制御機構があるためと考えられる。*E. coli* では分裂が阻害された後も増殖のためエネルギーを必要とする。しかし、コリネ型細菌ではその必要がない。そこで増殖や分裂に使われていたエネルギーは余剰エネルギーとなり、少なくともその一部が細胞外へのグルタミン酸の蓄積に消費されると考えられる。分裂を止める要因として penicillin をコリネ型細菌に作用させると、標的である PBPs に結合することで細胞内にシグナルを与える。この時 PBP-3 が受容体となる。シグナルを受けた細胞は増殖を止め、細胞内のエ

エネルギーフローを変化させ、今まで細胞の分裂や増殖に使っていたエネルギーを転用し、少なくともその一部をグルタミン酸の細胞外への蓄積に使うと考えた。細胞分裂遺伝子の一つ *ftsZ* 遺伝子の変異によるグルタミン酸の産生は確認していないが、細胞分裂の停止に伴い細胞増殖が止まり、共役機構の存在を裏付けるものであった。

以上のことから、コリネ型細菌におけるグルタミン酸の産生は本菌の持つ細胞分裂と細胞増殖における共役機構によって、*E. coli* 等では得られないエネルギーを生じ、それから転用されるものと考えた。

- Addinall SG, Lutkenhaus J FtsZ-spirals and -arcs determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 1996 22:231-237
- Adelberg EA Selection of bacterial mutants which excrete antagonists of antimetabolites. J Bacteriol 1958 76:326
- Amann E, Ochs B, Abel KJ Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. Gene 1988 69:301-315
- Araki K, Nakayama K Studies on histidine fermentation. Part I. L-Histidine production by histidine analog-resistant mutants from several bacteria. Agric Biol Chem 1971 35:2081-2088
- Beall B, Lowe M, Lutkenhaus J Cloning and characterization of *Bacillus subtilis* homologs of *Escherichia coli* cell division genes *ftsZ* and *ftsA*. J Bacteriol 1988 170:4855-4864
- Beall B, Lutkenhaus J Impaired cell division and sporulation of a *Bacillus subtilis* strain with the *ftsA* gene deleted. J Bacteriol 1992 174:2398-2403
- Beall B, Lutkenhaus J FtsZ in *Bacillus subtilis* is required for vegetative septation and for asymmetric septation during sporulation. Genes Dev 1991 5:447-455
- Bi EF, Lutkenhaus J FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. Nature 1991 354:161-164
- Birnboim HC, Doly J A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979 7:1513-1523

Bonnassie S, Oreglia J, Trautwetter A, Sicard AM Isolation and characterization of a restriction and modification deficient mutant of *Brevibacterium lactofermentum*. FEMS Microbiol Lett 1990 60:143-146

Bramhill D, Thompson CM GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubes Proc Natl Acad Sci U S A 1994 91:5813-5817

Callister H, Wake RG Characterization and mapping of temperature-sensitive division initiation mutations of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 1981 145:1042-1051

Clement Y, Escoffier B, Trombe M C, Laneelle G Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis triggering by biotin starvation or by surfactant addition J Gen Microbiol 1984 130:2589-2594

Clement Y, Laneelle G Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition J Gen Microbiol 1986 132:925-929

Dai K, Lutkenhaus J *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1991 173:3500-3506

de Boer P, Crossley R, Rothfield L The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. Nature 1992 359:254-256

DeVries JK, Zubay G DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the alpha-fragment of the enzyme beta-galactosidase. Proc Natl Acad Sci U S A 1967 57:1010-1012

Dewar SJ, Begg KJ, Donachie WD Inhibition of cell division initiation by an imbalance in the ratio of FtsA to FtsZ. J Bacteriol 1992 174:6314-6316

Dower W J, Miller J F, Ragsdale C W High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation Nucleic Acids Research 1988 16:6127-6145

Fernandez-Gonzalez C, Cadenas RF, Noirot-Gros MF, Martin JF, Gil JA Characterization of a region of plasmid pBL1 of *Brevibacterium lactofermentum* involved in replication via the rolling circle model. J Bacteriol 1994 176:3154-3161

Filpula D, Ally A H, Nagle J Complete nucleotide sequence of a native plasmid of *Brevibacterium lactofermentum* Nucleic Acids Research 1986 14: 5114

Flardh K, Garrido T, Vicente M Contribution of individual promoters in the *ddlB-ftsZ* region to the transcription of the essential cell-division gene *ftsZ* in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 1997 24:927-936

Gonzy-Treboul G, Karmazyn-Campelli C, Stragier P Developmental regulation of transcription of the *Bacillus subtilis ftsAZ* operon. J Mol Biol 1992 224:967-979

Goyal D, Wachi M, Kijima N, Kobayashi M, Yukawa H, Nagai K A cryptic plasmid pBL1 from *Brevibacterium lactofermentum* causes growth inhibition and filamentation in *Escherichia coli*. Plasmid 1966 36:62-66

Hale CA, de Boer PA Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. Cell 1997 88:175-185

Hiraga S, Niki H, Ogura T, Ichinose C, Mori H, Ezaki B, Jaffe A Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. J Bacteriol 1989 171:1496-1505

Hoischen C, Kramer R Membrane alteration is necessary but sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol 1990 172:3409-3416

Inui M, Vertes AA, Kobayashi M, Kurusu Y, Yukawa H Cloning and sequence determination of the acetohydroxy acid synthase genes from *Brevibacterium flavum* MJ233 by using the polymerase chain reaction. DNA Seq 1993 3:303-310

Itagaki S Cytological studies on *Micrococcus glutamicus*.

Part IV. The effect of biotin on the morphological character of *Micrococcus glutamicus*. (Japanese) Bot Mag Tokyo

Kendall, K. J., Cohen, S. N. Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 and correlation of the sequence with genetic properties J. Bacteriol 1988 170: 4634-4651

Kimura E, Abe C, Kawahara Y, Nakamatsu T Molecular cloning of a novel gene, *dtsR*, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from *Brevibacterium lactofermentum*. Biosci Biotechnol Biochem 1996 60:1565-1570

Kimura E, Abe C, Kawahara Y, Nakamatsu T, Tokuda H A *dtsR* gene-disrupted mutant of *Brevibacterium lactofermentum* requires fatty acids for growth and efficiently produces L-glutamate in the presence of an excess of biotin. Biochem Biophys Res Commun 1997

234:157-161

Kinoshita S, Nakayama K, Kitada S L-Lysine production using microbial auxotroph. J Gen Appl Microbiol 4:128-129 J Gen Appl Microbiol 1958 4:128-129

Kinoshita S, Nakayama K, Udaka S The fermentative production of L-ornithine J Gen Appl Microbiol 1957 3:276-277

Kinoshita S, Udaka S, Shimono M Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J Gen Appl Microbiol 1957 3: 193-205

Kobayashi M, Asai Y, Hatakeyama K, Kijima N, Wachi M, Nagai K, Yukawa H Cloning, sequencing, and characterization of the *ftsZ* gene from coryneform bacteria. Biochem Biophys Res Commun 1997 236:383-388

Kramer R Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism FEMS Microbiol Lett 1994 13:75-94

Kurusu Y, Kainuma M, Inui M, Satoh Y, Yukawa H Electroporation-transformation system for coryneform bacteria by auxotrophic complementation. Agric Biol Chem 1990 54:443-447

Labarre J, Reyes O, Guyonvarch A, Leblon G Gene replacement, integration, and amplification at the *gdhA* locus of *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol 1993 175:1001-1007

- Lennox E S Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1955 1: 190-206.
- Lewin CS, Morrissey I, Smith JT The bactericidal activity of sparfloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1992 30:625-632
- Lutkenhaus JF, Wolf-Watz H, Donachie WD Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus (*ftsZ*). *J Bacteriol* 1980 142:615-620
- Lutkenhaus J FtsZ ring in bacterial cytokinesis. *Mol Microbiol* 1993 9:403-409
- Margolin W, Corbo JC, Long SR Cloning and characterization of a *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* cell division gene *ftsZ*. *J Bacteriol* 1991 173:5822-5830
- Martin JF, Santamaria R, Sandoval H, del Real G, Mateos LM, Gil JA, Aguilar A Cloning systems in amino acid-producing corynebacteria *Biotechnolgy* 1987 5: 137-146
- McCormick JR, Su EP, Driks A, Losick R Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene *ftsZ*. *Mol Microbiol* 1994 14:243-254
- Miwa K, Matsui H, Terabe M, Nakamori S, Sano K, Momose H Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria *Agric Biol Chem* 1984 48:2901-2903
- Miwa K, Matsui K, Terabe M, Ito K, Ishida M, Takagi H, Nakamori S, Sano K Construction of novel shuttle vectors and a cosmid vector for the glutamic acid-producing

- bacteria *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 1985 39:281-286
- Miyamoto T, Yamaguchi K, Sayed MA, Sasahara R, Honjoh K, Hatano S Penicillin-binding protein sensitive to cephalexin in sporulation of *Bacillus cereus*. *Microbiol Res* 1997 152:227-232
- Mukherjee A, Dai K, Lutkenhaus J *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 90:1053-1057
- Nakayama K, Kitada S, Kinoshita S Studies on lysine fermentation. I. The control mechanism on lysine accumulation by homoserine and threonine. *J Gen Appl Microbiol* 1961 7: 145-154
- Nunheimer TD, Birnbaum J, Ihnen ED, Demain AL Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl Microbiol* 1970 20:215-217
- Plakunov V K, Volkova I M, Lebedeva Z D Role of excretion in the overproduction of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* 1992 61:189-193
- RayChaudhuri D, Park JT *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* 1992 359: 251-254
- Rothfield LJ, Justice SS Bacterial cell division: the cycle of the ring. *Cell* 1997 88:581-584
- Sandoval H, Del Real G, Mateos L M, Aguilar A, Martin J F Screening of plasmids in non-pathogenic corynebacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1985 27: 93-98.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977 74:5463-5467
- Sano K, Shiio I Microbial production of L-lysine. III. Production by mutants resistant to S-(2-aminoethyl)-L-cysteine. J Gen Appl Microbiol 1970 16: 373-391
- Santamaria R, Gil J A, Mesas J M, Martin J F Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum* J Gen Microbiol 1984 130: 2237-2246
- Shiio I, Nakamori S Microbial production of L-threonine. Part II. Production by α -amino-b-hydroxyvaleric acid resistant mutants of glutamate producing bacteria. Agric Biol Chem 1970 34: 448-456
- Shiio I, Otsuka S, Takahashi M Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. J Biochem 1962 51: 56-62
- Shiio I, Ozaki H, Ujigawa-Takeda K Production of aspartic acid and lysine by citrate synthase mutants of *Brevibacterium flavum*. Agric Biol Chem 1982 46: 101-107
- Smith M D, Flickinger J L, Lineberger D W, Schmidt B Protoplast transformation in coryneform bacteria and introduction of an α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* into *Brevibacterium lactofermentum*. Appl Environ Microbiol 1986 51, 634-639.
- Spratt BG Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. Proc Natl Acad Sci U S A 1975a 72:2999-3003

Spratt BG Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli* Nature 1975b 254:516-517

Takinami K, Yoshii H, Tsuru H, Okada H Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. Part III. Biotin-Tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. Agric Biol Chem 1965 29 :351-539

Tamaki S, Nakajima S, Matsushashi M Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein-1Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 1977 74: 5472-5476

Vertes A A, Hatakeyama K, Inui M, Kobayashi M, Kurusu M, Yukawa H Replacement recombination in coryneform bacteria: High efficiency integration requirement for non-methylated plasmid DNA Biosci. Biotech. Biochem. 1993 57:2036-2038

Vertes AA, Inui M, Kobayashi M, Kurusu Y, Yukawa H Isolation and characterization of IS31831, a transposable element from *Corynebacterium glutamicum*. Mol Microbiol 1994 11:739-746

Wang X, Lutkenhaus J The FtsZ protein of *Bacillus subtilis* is localized at the division site and has GTPase activity that is dependent upon FtsZ concentration. Mol Microbiol 1993 9:435-442

Wang X, Lutkenhaus J FtsZ ring: the eubacterial division apparatus conserved in archaeobacteria. Mol Microbiol 1996 21:313-319

- Yamaguchi R, Terabe M, Miwa K, Sano K, Tsuchiya M, Takagi H, Morinaga Y, Nakamori S, Momose H, Yamazaki A Determination of the complete nucleotide sequence of the *Brevibacterium lactofermentum* plasmid pAM330 and the analysis of its genetic information. Nucleic Acids Symp Ser 1985;16:265-267
- Yi QM, Lutkenhaus J The nucleotide sequence of the essential cell-division gene *ftsZ* of *Escherichia coli*. Gene 1985 36:241-247
- Yi QM, Rockenbach S, Ward JE Jr, Lutkenhaus J Structure and expression of the cell division genes *ftsQ*, *ftsA* and *ftsZ*. J Mol Biol 1985 184:399-412
- Yoshihama M, Higashiro K, Rao EA, Akedo M, Shanabruch WG, Follettie MT, Walker GC, Sinskey AJ Cloning vector system for *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol 1985 162:591-597
- Yukawa H, Terasawa M L-isoleucine production by ethanol utilizing micro-organism Process Biochem. 1986 21:196-199
- Yukawa H, Yamagata H, Terasawa M Production of L-malic acid by the cell reusing process Process Biochem 1986 21:164-166

謝辞

本研究の遂行に際し、終始ご指導賜りました東京工業大学教授永井和夫博士に篤く御礼申し上げます。直接ご指導頂きました東京工業大学助教授和地正明博士に心より感謝いたします。また実験遂行に当たり有益なご助言ご指導頂いた東京工業大学助手片岡孝夫博士、東京工業大学助手禹済泰博士ならびに東京工業大学技官高田綾子女史に心より感謝いたします。最後に本論文作成および本研究遂行に当たりご助言ご協力いただきました東京工業大学細胞工学講座のみなさまに感謝いたします。