グルタミン酸生産菌群の分類学的研究 (第 3 報)

DNA の塩基組成

高山健一郎, 阿部重雄, 木下祝郎 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 40 年 5 月 10 日 受理

Taxonomical Studies on Glutamic Acid Producing Bacteria
Part III. on the Base Composition of DNABy Ken-ichiro TAKAYAMA, Shigeo ABE and Shukuo KINOSHITA
Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

The base compositions of DNA from representative strains belonging to twelve types of glutamic acid producing strains were measured.

The twelve types were, further, grouped into three groups according to the guanine-cytosine content (G-C).

The group of 53% G-C was consisted of type 1 to type 10. The strains of this group showed higher activities of glutamic acid production than the other and rapidly produced acid from glucose. The most of glutamic acid producing microorganisms belong to this group.

The group of 53% G-C was consisted of type 11 which produced neither urease nor nitrites from nitrates.

The group of 65% G-C was consisted of type 12 which slowly and weakly produced acid from glucose and did not produce urease.

Thermal denaturation temperature (T_m) of *M. glutamicus* KY 9003 and KY 9002 which belonged to the group of 56% G-C, were measured. The T_m of the former strain was 92.3°C (corresponds to 56% G-C) and the T_m of latter was about 89°C (corresponds to 48% G-C).

(Received May 10, 1965)

緒 言

生物の種特異性が DNA の塩基組成あるいはその配列の反映であるということは近年明らかにされてきた事実である。バクテリアについても Lee⁽¹⁾ 以来多くのデータが報告され⁽²⁻⁷⁾, 分類との関連性が論議されてきている。

著者らは前報⁽⁸⁾においてグルタミン酸生産菌 207 株を 12 type に分類したが, その類縁性を明らかにする一助として, それらの代表菌株について DNA を分離・調製し塩基組成を求めたので報告する。

実験方法

(1) 供試菌株: グルタミン酸生産菌各 type の代表的な菌株 1~数株を選び実験に使用した。なお対照実験として *E. coli* K-12 を用いた。

(2) 菌体: DNA 調製に用いた菌体は次のようにして得た。グルコース・ブイヨン 20 時間振盪培養菌体

を種培養とし, 500 ml グルコース・ブイヨン/2 l ヒダ付三角フラスコに 10% 宛接種, 6 時間振盪培養を行ない遠心分離により集菌して試料とした。

(3) DNA 調製法: DNA の調製は Marmur 法⁽⁹⁾ 及び斎藤らの方法⁽¹⁰⁻¹¹⁾ を参考にし若干の改良を加えて行なった。調製法の概略を Fig. 1 に示す。

試薬

食塩-EDTA: 0.15 M NaCl+0.1 M EDTA.

ラウリル硫酸ソーダ (SLS と略す)。

フェノール-緩衝液: フェノール: トリス-SLS 緩衝液 = 4:1.

トリス-SLS 緩衝液: 0.1 M-トリス緩衝液, 1% SLS, 0.1% NaCl (pH 9).

食塩-クエン酸ソーダ: 0.15 M NaCl+0.015 M クエン酸ソーダ (pH 7).

Fig. 1. Preparation Procedures for DNA
(A)~(G): refer to Table II.

希食塩-クエン酸ソーダ: 0.015 M NaCl+0.0015 M
クエン酸ソーダ.

濃食塩-クエン酸ソーダ: 1.5 M NaCl+0.15 M クエン
酸ソーダ.

酢酸-EDTA: 3 M 酢酸ソーダ+0.001 M EDTA (pH
7).

リボスクレアーゼ: 第一化学薬品工業株式会社製.

(4) 定量法: DNA 各塩基の定量は Bendich の
Methods in Enzymology 記載の方法⁽¹²⁾に準じた. すな
わち 70% 過塩素酸により 100°, 1 時間加水分解しイソ
プロパノール: 塩酸: 水=65:17:18 の溶媒により展
開分離し, 0.1 N 塩酸, 30°, 1 時間振盪抽出, 遠心分離
上清を測定し各吸収係数から計算により各塩基量を求め

た. なお濾紙は東洋濾紙 No. 51A を使用した.
融解温度 (T_m) の測定は Marmur の方法⁽¹³⁾
に従った.

細胞あるいは粗抽出物は Schmidt-Thann-
hauser 法⁽¹⁴⁾及び Schneider 法⁽¹⁵⁾により分画
分析した. DNA, RNA 及び蛋白質の定量はジ
フェニルアミン法⁽¹⁶⁾, オルシノール法⁽¹⁷⁾ 及び
銅-フォリン法⁽¹⁸⁾によった.

実 験

(1) DNA の調製について

DNA の調製は要するに菌体からの抽出と蛋
白質及び RNA の除去にある. *M. glutamicus*
の細胞壁が破壊され難い事実は先に宇田川ら⁽¹⁹⁾
が認めており, また著者らも経験するところで
ある. 宇田川らはリゾチーム, トリプシン, 超
音波の 3 処理により溶菌させ DNA を得ている
が, その収率はよくない.

溶菌法として種々の方法が用いられているが,
Marmur⁽⁹⁾, 斎藤⁽¹¹⁾によると SLS 及びリゾチ
ーム処理が分子量並びに形質転換能の点から最
良とされている.

そこで SLS 及びリゾチーム処理を中心とし
てグルタミン酸生産菌の溶菌を試み, 比濁の減
少, DNA 抽出率 (フェノール 1 回処理後) の
点から検討した結果が Table I である. SLS
処理あるいはリゾチーム短時間処理では細胞懸
濁液の粘稠化は起らず DNA もほとんど抽出さ
れない. リゾチーム 2 時間処理, 凍結融解後
SLS 処理を行なうとかなり溶菌が認められ,

Table I. Recovery of DNA by Various Methods

Method	Turbidity %	Recovery of DNA %
SLS 60°C, 10 min.	91	2.1
SLS 70°C, 10 min.	88	3.0
Lz 30 min.→SLS 70°C, 10 min.	70	8.0
Lz 60 min.→SLS 70°C, 10 min.	65	12.0
Lz 120 min.→SLS 70°C, 10 min.	71	10.0
Lz 30 min.→freezing →SLS 70°C, 10 min.	62	11.0
Lz 60 min.→freezing →SLS 70°C, 10 min.	58	9.5
Lz 120 min.→freezing →SLS 70°C, 10 min.	39	16.6
Freezing→SLS 70°C, 10 min.	86	3.0
Vibrogen 5 min→SLS 70°C, 10 min.	54	19.0
Vibrogen with SLS 5 min.	45	30.5

Strain: *M. glutamicus* 534, KY 9002. SLS: 2%.
Lz: Lysozyme, 6.7 mg/1 g wet cell/10 ml saline-EDTA,
shaked at 37°C on a Monod shaker.

Table II. Purification of DNA

Sample	DNA mg	RNA mg	RNA DNA	Recovery of DNA %
(A) Whole cell (wet packed : 10 g)	95.0	600	6.3	100
(B) 1st phenol-buffer treatment	23.0	130	5.7	24.2
(C) Deproteinization	19.2	99	5.2	20.2
(D) 4M-NaCl treatment	18.5	19.5	1.05	19.5
(E) RNase treatment	15.3	3.6	0.24	16.1
(F) 1st isopropanol precipitate	13.0	1.6	0.12	13.7
(G) 3rd isopropanol precipitate	11.2	0.4	0.04	11.8

Strain : *M. glutamicus* 534 (KY 9002) (A)~(G) : see Fig. 1
0.3 mg protein contained in the sample (G)

DNA も抽出されるが抽出率は Vibrogen (ドイツ Buhler 社製, ガラス玉と振盪磨碎) に劣る。リゾチウム処理の場合, 振盪条件がかなり影響しているような事実が認められた。またヒューズ・プレス (大岳製作所製) を使用したところ, Vibrogen 処理の場合と同程度の DNA 標品が得られた。

Table II は DNA 精製過程における DNA 及び RNA の収率, 含量比の一例を示したものである。菌体量は湿量 10 g (乾量 3.3 g に相当) である。蛋白質の除去に

はフェノールの他にクロロホルム, オクタノールなどが用いられており, 各々一長一短があるが, フェノールは他に較べて除蛋白の操作回数が少ないことが大きな利点である。RNA の除去にはリボスクレアーゼ処理の他, 高濃度食塩で高分子 RNA を沈殿除去する方法⁽²⁰⁾を併用して効果を得た。その後イソプロパノール沈殿を数回繰り返すことによりかなり純粋な DNA が得られた。

(2) グルタミン酸生産菌各 type の DNA の塩基組成

前報⁽⁸⁾に示したグルタミン酸生産菌各 type の代表菌株について DNA の塩基組成を求めた結果が Table III である。

Type 1~10 の菌群はグルタミン酸生産能の高いグループであるが, これらの G-C 含量は 56~57% である。これに反して Type 11 すなわちウレアーゼ, 硝酸還元ともに陰性の菌株は 2 株とも 53% でやや低い値を示し

Table III. Base Composition of DNA from Glutamic Acid Producing Strains.

Type	Strain	mol. %				Pur Pyr	G-C %
		G	A	C	T		
1	KY 9002 (<i>M. 534</i> , ATCC 13032)	28.2	21.5	28.6	21.7	0.99	56.8
	KY 3805 (<i>Brevib. aminogenes</i> No. 9)	28.6	21.5	28.2	21.7	1.00	56.8
	KY 3460 (<i>Brevib. divaricatum</i> NRRL 2311)	28.4	21.0	28.6	22.0	0.98	57.0
	KY 10122 (<i>Brevib. flavum</i> ATCC 14067)	28.2	21.5	28.6	21.7	0.99	56.8
	KY 3509 (<i>Coryneb. lilium</i> NRRL B-2243)	28.6	21.9	28.2	21.3	1.02	56.8
	KY 9614	29.0	21.7	28.0	21.3	1.03	57.0
	KY 10125 (<i>Brevib. saccharolyticum</i> ATCC 14066)	28.5	21.5	28.0	21.0	1.00	56.5
	KY 10124 (<i>Brevib. roseum</i> ATCC 13825)	28.6	21.9	28.0	21.5	1.02	56.6
	KY 10026	29.1	21.5	27.8	21.6	1.02	56.9
	KY 10123 (<i>Brevib. lactofermentum</i> ATCC 13869)	29.0	21.5	27.6	21.8	1.01	56.6
2	KY 9606	28.2	21.5	28.3	22.0	0.99	56.5
3	KY 9005 (<i>M. 588</i>)	29.2	20.8	28.3	21.7	1.00	57.5
4	KY 9003 (<i>M. 560</i> , ATCC 13761)	29.5	21.1	28.2	21.2	1.02	57.7
5	KY 10021	28.6	21.2	28.2	22.0	0.99	56.8
	KY 3807 (<i>Brevib. aminogenes</i> No. 121)	29.2	21.3	28.5	21.0	1.02	57.7
6	KY 9026	28.8	21.3	27.5	22.4	1.00	56.3
	KY 3462 (<i>Brevib. ammoniagenes</i> Aida)	28.7	22.8	26.9	21.6	1.06	55.6
7	KY 9610	28.4	22.0	27.8	21.8	1.01	56.2
8	KY 9594	29.7	21.4	27.0	21.9	1.04	56.7
9	KY 9024	28.0	21.8	28.0	22.2	0.99	56.0
	KY 3461 (<i>Brevib. divaricatum</i> NRRL 2312)	27.7	21.9	27.8	22.6	0.98	55.6
	KY 10126 (<i>Brevib. immariophilum</i> ATCC 14068)	28.2	21.5	28.2	22.1	0.99	56.4
	KY 10127 (<i>Coryneb. acetacidophilum</i> ATCC 13870)	28.8	20.3	28.5	22.5	0.97	57.3
10	KY 9602	28.4	21.1	28.6	21.9	0.98	57.0
11	KY 9007 (<i>M. 591</i>)	26.5	23.4	27.1	23.1	1.00	53.6
	KY 3510 (<i>Coryneb. callunae</i> NRRL B-2244)	26.7	23.8	26.4	23.1	1.02	53.1
12	KY 9591	33.6	17.6	32.0	16.8	1.03	65.6
	KY 10101	31.5	18.5	32.9	17.1	1.00	64.4
	<i>E. coli</i> K-12	25.6	24.7	24.9	24.8	1.01	50.3

G : Guanine, A : Adenine, C : Cytosine, T : Thymine, Pur : Purine, Pyr : Pyrimidine

Table IV. G-C content of DNA by Tm and Chemical Analysis.

Strain	Experiment	Tm		Chem. Anal. G-C %
		Tm(°C)	G-C %	
KY 9002 (Type 1)	1	89.1	48.3	56.8
	2	87.9	45.4	56.3
	3	89.4	49.0	56.7
KY 9003 (Type 4)		92.3	56.1	57.7
<i>E. coli</i> K-12	1*	91.0	52.9	51.0
	2**	90.5	51.7	50.3

* lysis with SLS, ** lysis with vibrogen

た。また炭水化物から酸の生成が弱くウレアーゼ陰性の Type 12 は試験した 2 株とも 65% でかなり高い値を示した。

(3) 融解温度 (Tm)

DNA の G-C% を Tm から求める方法が Marmur^(9,21) により提唱され、2~3 の研究者によりデータが報告されている^(4,22-25)。著者らも若干の DNA 標品について Tm を測定したのでその結果の一部を Table IV に示す。

Tm の値にかなりのふれが生じるため確定的な結論はいえないが、KY 9002 の場合 Tm から計算した G-C% は化学分析から求めた値に較べて低い値を示すことは明らかである。これに反して KY 9003 の場合はほぼ同じ値を示した。一方 *E. coli* について、SLS 処理及び Vibrogen 処理の 2 方法によつて DNA を調製し、Tm 法及び化学分析によつて G-C 含量を求めたが、両者とも同様の結果が得られた。従つて KY 9002 における差違が DNA 調製法にのみ起因しているとは断定できない。

Smith⁽²²⁾ は軟体動物の DNA で Tm と密度勾配遠心法、榊原⁽²⁴⁾ は枯草菌孢子 DNA で Tm と化学分析の方法で測定した G-C 含量が異なることを報告している。これらの事実から Tm の値は塩基組成以外に何らかの条件に影響されていると考えられる。

考 察

グルタミン酸生産菌は塩基組成 (G-C%) の点から 53, 56 及び 65 の 3 グループに分けられる。各グループの菌学的性質の差違を Table V に要約する。

G-C 比 56% のグループはこれまで *M. glutamicus* として報告してきた *M. 534* (ATCC 13032), *M. 560* (ATCC 13761) あるいは *Brevib. aminogenes*, *B. divaricatum*, *B. flavum*, *B. lactofermentum*, *B. roseum*, *B. saccharolyticum*, *Coryneb. lilium* などグルタミン酸生産能の極めて高い菌株を含む。このグループに属す

Table V. Relation between G-C content and Physiological Characteristics of Glutamic Acid Producing Strains.

G-C %	Acid from glucose	Urease	NO ₂	Type
55.5~57.7	+	+	+, (+)	1~8
	+	+	—	9
	+	—	+	10
53.1~53.6	+	—	—	11
64.5~65.6	(+)	—	+	12

(+) : slowly and weakly positive

る Type 1~10 はウレアーゼ、硝酸還元性、シュクロース、サリシン、マンニット、マルトースからの酸生産能中若干を異にしているが、これらの違いによって塩基組成は異ならない。また Type 1 は最も多くの菌株を含んでいるが、試験した 10 菌株は菌体色素 (黄、淡黄、乳白、淡桃)、硝酸還元性の強弱、メチルレッド試験の弱陰、菌環あるいは菌膜を容易に形成するものとししないもの、ビオチン以外にビタミン B₁ を要求するものなどの違いがあるが、これらの違いによつても塩基組成は異ならない。

G-C 比 53% のグループは Type 11 の KY 9007 及び *Coryneb. callunae* の 2 菌株であり、前者が黄色、後者が乳白色である以外は同一でウレアーゼ、硝酸還元性ともに陰性である。また両菌株とも DNA 調製の際、沈殿が繊維状になり難く精製が困難であった。

G-C 比 65% のグループは Type 12 であり、グルコースからの酸生成がやや劣りウレアーゼ陰性である。実験に用いた 2 菌株は酸生成の点で若干異なるが、2 株ともグルコース・ブイオンにおける生育が不良で菌体収量が悪かった。

このように Type 11 及び Type 12 は塩基組成のみならず、DNA 調製過程における様相も G-C 比 56% のグループと異なっている。それ故 Table V に示した以外の性質も異なっていることも考えられる。

われわれはこれまでグルタミン酸生産菌を一括して *Micrococcus glutamicus* (*Corynebacterium glutamicum*⁽²⁶⁻²⁷⁾) と呼んできた。今回の実験によつて Type 1~10 のグループは塩基組成も同一であることが判り、多くの菌学的諸特性も共通であるところから、同一 species あるいは極めて近縁の species であることがあらためて確認された。Type 11 及び Type 12 の菌株は DNA の塩基組成が異なる。塩基組成の異なる菌株を同一種名で呼ぶことは無理であるかも知れない。しかしながら、現

在バクテリアの分類と DNA の塩基組成の關係に定かな確説はない。

Bacillus subtilis⁽⁶⁾, *Bacillus megatherium*⁽⁶⁾, *Bacillus cereus*⁽⁴⁾ などにおいては同一 species の中に塩基組成の異なる菌株が含まれている。*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* は species (genus) を異にするが塩基組成は同様であり⁽¹⁻⁸⁾, 遺伝形質の伝達が可能である⁽²⁸⁾。また *Bacillus subtilis* と *Bacillus megatherium* の間⁽⁶⁾, あるいは *Neisseri* 属間⁽⁶⁾ においては, 塩基組成, species が異なるにもかかわらず遺伝形質の伝達の可能な場合がある。

上記の例からもわかるように, 塩基組成と分類との關係には種々の矛盾が含まれており, 今後の研究の進展が待たれる。グルタミン酸生産菌群は Table V に示したごとく, DNA の塩基組成から大別すれば3グループに分別しうるが, 諸種の菌学的性質, グルタミン酸生産能力の観点から, *Corynebacterium glutamicum* (*Micrococcus glutamicus*) として総括したい。

要 約

グルタミン酸生産菌株各 type の代表菌株について DNA を Marmur 及び斎藤らの方法に若干の改良を加えて調製し, その塩基組成を求めた。

グルタミン酸生産菌は塩基組成の点から3グループに分かれる。G-C 比 56% のグループは Type 1~10 でグルタミン酸生産能が特に高く, グルコースからの酸生成が速やかな菌群であり, グルタミン酸生産菌株の大多数を占める。G-C 比 53% のグループはウレアーゼ, 硝酸還元ともに陰性の Type 11, G-C 比 65% のグループはグルコースから酸生成能弱くウレアーゼ陰性の Type 12 が該当する。

融解温度 (Tm) を測定したところ, G-C 比 56% の菌株中 KY 9003 は 92.3° (G-C 比 56% に相当), KY 9002 はほぼ 89° (ほぼ 48% に相当) と異なる値を示した。

終りに臨み, 本報文に対し御校閲を賜った東大応微研北原覚雄先生並びに御指導御鞭撻を賜った東大応微研斎藤日向先生に厚く御礼申し上げます。また実験に御協力いただいた阿保光子嬢に深謝する。

本報告の要旨は昭和 39 年 7 月 19 日, 日本農芸化学会大会で発表した。

- (1) K. Y. Lee, R. Wahl, E. Barbu : *Ann. Inst. Pasteur*, **91**, 212 (1956).
- (2) A. N. Belozersky, A. S. Spirin : "The Nucleic Acids", Vol. 3, ed. by E. Chargaff and J. N. Davidson, Academic Press, New York, p. 147 (1960).
- (3) N. Sueoka : *J. Mol. Biol.*, **3**, 31 (1960).
- (4) W. C. McDonald et al., : *J. Bact.*, **85**, 1071 (1963).
- (5) B. W. Caltin, L. S. Cuninghame : *J. Gen. Microbiol.*, **26**, 303 (1961).
- (6) 斎藤日向 : 日生化総会講演 (1963, 10, 東京).
- (7) 鈴木慈郎, 北原覚雄 : 日農化大会講演 (1963, 4, 東京).
- (8) 高山健一郎, 阿部重雄, 木下祝郎 : 本誌, **39**, 335 (1965).
- (9) J. Marmur : *J. Mol. Biol.*, **3**, 208 (1961).
- (10) H. Saito, K. Miura : *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 619 (1963).
- (11) 斎藤日向 : 蛋白質・核酸・酵素, **9**, 102 (1964).
- (12) A. Bendich : *Methods in Enzymol.*, **3**, 715 (1957).
- (13) J. Marmur, P. Doty : *J. Mol. Biol.*, **5**, 109 (1962).
- (14) C. Schmidt, S. J. Thannhauser : *J. Biol. Chem.*, **161**, 83 (1945).
- (15) W. C. Schneider : *ibid.*, **161**, 293 (1945).
- (16) Z. Dische : "The Nucleic Acids", Vol. 1, ed. by E. Chargaff and J. N. Davidson, Academic Press, New York p. 285 (1955).
- (17) G. Ceriotti : *J. Biol. Chem.*, **214**, 59 (1955).
- (18) O. H. Lowry et al. : *ibid.*, **193**, 265 (1951).
- (19) 宇田川清, 阿部重雄, 木下祝郎 : 日農化大会講演 (1961, 4, 福岡).
- (20) 川出由己, 北村とも子 : 日化, **78**, 1801 (1957).
- (21) J. Marmur, P. Doty : *Nature*, **183**, 4673 (1959).
- (22) M. Smith, D. B. Quayle : *ibid.*, **200**, 676 (1963).
- (23) 飯塚 広, 新井英夫, 西村行正 : 日農化大会講演 (1964, 7, 札幌).
- (24) 榊原詳公, 斎藤日向, 池田庸之助 : 日農化大会講演 (1964, 7, 札幌).
- (25) G. F. Gause et al. : *Nature*, **203**, 598 (1964).
- (26) 木下祝郎, 板垣史郎, 中山 清 : *Amino Acids*, **2**, 42 (1960).
- (27) S. Kinoshita : *Recent Progress in Microbiol.*, **8**, 334 (1962).
- (28) S. E. Luria, J. W. Burrous : *J. Bact.*, **74**, 461 (1957).