

<特別講演文>

Coryneform bacteria의 分類에 關하여

東京大學 應用微生物研究所  
駒形 和男 (農學博士)

1. 序 言

應用微生物學의 分野에서 새로운 醱酵工業이 생겨서 그 工業이 發展하여온 過程을 볼것같으면 거기에는 恒常 새로운 微生物을 分離하여 그들의 機能을 開發하여 왔다는 事實을 알수있습니다. 따라서 微生物의 分離, 分類, 同定에 對한研究는 單純히 學問上의 興味뿐만아니라 産業上의 利權問題와 도일켜여서 應用微生物學의 分野에서는 極히 重要한 研究課題일 것입니다.

예를들면 應用微生物分野에서 그다지 關心을 갖지 않았던 放線菌(Actinomycetes)이 抗生物質工業의 主役을 맞게되자 世界의 研究者들은 一切히 이들 微生物의 分離를 實施하여 그들의 物性を 研究하였읍니다. 이런 事實은 放線菌의 分類學的 研究를 刺戟하게되고 分類나 同定에 關한 研究結果가 많이 報告되었읍니다. 그러나 研究歷史가 짧기 때문에 모든 研究者들의 생각이 一致되는 分類體系가 없으며 그 때문에 몇가지 特許上의 紛爭이 있었다는 말도 들고 있습니다.

그리고 글루타민산醱酵을 爲始하여 各種 아미노酸醱酵도 앞서말한 放線菌의 例와 類似합니다. 글루타민산醱酵의 研究는 1957年에 木下博士를 中心으로하는 協和醱酵의 研究陳에 依하여 始作되었으며 이어서 大學 其他 民間會社들도 研究하게 되고 現在에 와서는 大規模의 醱酵工業으로 成長하였다는 事實은 여러분도 잘 알고 있는 바와 같습니다. 한편 아미노酸醱酵의 研究가 發展되므로써 從來 應用微生物學에서 거의 對象으로되지 않았던 微生

物群가운데서 새로운 有用微生物을 分離開發한 것도 極히 重要한 일이기도 합니다.

글루타민산生産菌으로서 最初로 報告된 菌種에는 *Micrococcus glutamicus*입니다만 以後도 多數의 글루타민산生産菌이 報告되고 있습니다. 그런데 이들 細菌은 一般的으로 몇가지 共通된 性質을 가진다고하나 分類上의 位置에 對하여서는 各研究者에 따라 見解가 다르며 類似한 細菌이 몇가지屬으로 同定되고 있습니다. 이것은 글루타민산을 多量蓄積하는 細菌이 所謂 *Coryneform bacteria*에 屬하며 이들細菌群에 包含되는 屬의概念 (generic concept)이나 屬의境界가 明確하지 않기때문에 생긴 混亂이라고 생각 합니다.

이와같이 *Coryneform bacteria*는 分類學的 研究가 進步되어있지 않기때문에 여러가지問題가 일어나고 있다는것을 判斷하였으므로 우리들은 13年前부터 「*Coryneform bacteria*은 어떠한 細菌인가」, 「他細菌과의 相互關係는 어떠한 것인가」, 「*Coryneform*는 어떻게 分類하면 좋은것인가」와 같은 基本的인것을 밝히기 위하여 이 研究를 始作하여 現在도 研究를 繼續하고 있는것 입니다. 卽 *Coryneform bacteria*의 分類가 混亂되어 있기 때문에 생겨 있는 여러가지 問題는 *Coryneform bacteria*를 먼저 基礎微生物學 (basic microbiology 또는 general microbiology)의 見地에서 研究하여 「生物」로서의 *coryneform bacteria*의 特性을 밝히지 않으면 解決되지 않는다고 생각하였던것 입니다.

## 2. Coryneform bacteria

Coryneform bacteria는 大體로 어떠한 細菌이며 어떠한 研究經過를 거쳐 그들의 分類는 어떻게 混亂하였던가를 말씀드리겠습니다. Coryneform bacteria라는 細菌群은 應用微生物分野에서는 그다지 取扱되지 않았으나 醫學細菌學이나 土壤微生物學의 分野에서는 옛날부터 알려져 있습니다. Coryneform bacteria는 지프테리아菌(Corynebacterium-diphtheriae)을 代表로 하는 Corynebacterium屬 細菌과 形態적으로 區別하기 어려운 細菌의 總稱이며 嚴密히 말하면 細菌分類學上的 用語는 아닙니다.

Corynebacterium은 1896년에 Lehmann과 Neumann이 지프테리아菌을 標準種(type species)으로 하여 그 細胞形態, 染色性, 寒天平板上의 生育特徵에 따라 創設한 屬이며 當時는 다음과 같은 屬의 概念을 가지고 있었습니다.

1. 病原性이 있거나 적어도 動物寄生性이다.
2. 細胞形態가 不規則하며 때로는 棍棒狀(club-shape)으로 된다.
3. 内生孢子(endospore)를 形成치 않는다.
4. 運動性이 있다.
5. gram陽性이며, 간혹 下規則한 染色性을 나타낸다.
6. 非抗酸性(non-acid fast)이다.
7. 好氣性(Aerobes)이다.

그런데 그後 動物以外的 土壤에서도 腐生性(saprophytic)으로서 形態적으로 지프테리아菌과 同一한 細菌이 分離되어 이것을 Corynebacterium에 包含시켰기 때문에 Corynebacterium이라는 屬의 概念이 擴大解釋되어 지프테리아菌과 같은 animal diphtheroid와는 상당히 다른 saprophytic의 soil diphtheroid라 할수있는 細菌까지도 Corynebacterium에 包含되 . . . 있다. 故에 細菌分類學上的 收拾을 할수가 없게되어 이들을 一括하여 Coryneform bacteria라고 부르지 않으면 안되게 되었다고

### Coryneform bacteria

Aerobic	}	Corynebacterium
Non-spore forming		Microbacterium
No acid-fast		Cellulomonas
Gram-positive		Arthrobacter
Rod-shaped bacteria		Brevibacterium

Table 1. Coryneform bacteria의 性質과 이에 포함되는 屬

생각됩니다.

一般的으로 Coryneform bacteria에는 好氣性(aerobic), gram陽性, 非抗酸性, 無胞子の 桿菌이 包含되며 Jensen의 見解에 따르면 Bergey's manual (7版)에 記載되어 있는 Corynebacterium, Arthrobacter, Microbacterium, Cellulomonas, Brevibacterium, 그리고 通性嫌氣性의 Propionibacterium이 包含되는 것입니다. 이들屬은 다시 Mycobacterium, Proactinomyces, Nocardia등으로 이어지는 細菌群이라고 생각되고 있습니다. 이와같이 Coryneform bacteria는 廣範圍한 屬을 包含하는 細菌群입니다. 또한 Coryne라는 말은 羅典語이며, 棍棒狀(club-shape), 쪼기모양(Wedge), V字型이라는 意味를 가지며 Coryneform bacteria라는 . . . 1923년에 Ørskov가 처음으로 使用하였다고 알려져 있습니다.

다음에 Coryneform bacteria들의 特徵을 좀더 詳細히 말씀드릴까 합니다.

### (1) 細胞形態

Corynebacterium에는 방금 말씀드린바와 같이 棍棒型, V字型, 球狀등 不規則한 細胞形態인 것이 特徵이며 간혹 y字型등으로 分岐(branching)한 胞細를 볼수있습니다. 典型的인 soil diphtheroid인 Arthrobacter 가운데는 cyst(cystite)라고하는 大型의 球狀細胞를 만드는 것이 있습니다.

### (2) 染色性

Coryneform bacteria에 包含되는 細胞는 gram陽性입니다만 이들중에는 弱陽性(Weakly gram positive)인것도 있으며 典型的인 gram陽性인것만 있는것은 아닙니다. 또 Corynebacterium은 抗酸性이 없는 것으로서 Mycobacterium과 區別되고 있는데 現在 Corynebacterium라고 同定되고 있는 菌種중에는 抗酸性을 나타내는 것이 알려지고 있습니다. 지프테리아菌에서 볼수있는 異染顆粒(metachromatic granules)도 Corynebacterium의 特徵이라 되어있지만 이것도 모든 Corynebacterium屬細菌에 共通의인 性質이라고는 할수 없습니다.

### (3) 細胞分裂樣式

Coryneform bacteria는 snapping이라는 特徵있는 細胞分裂樣式으로서 增殖되는 것이 옛부터 알려져 있습니다. 이것은 細胞가 한쪽方向으로 꺾기면서 分裂하는 것으로서 그 結果V-字型을 나타내게되는 것입니다. 그러나 直接顯微鏡下에서 細菌

의 細胞가 分裂되고 있는 것을 觀察하기가 어려우므로 V-字形이나 zigzag로 配列된 細胞들을 snapping分裂된 것으로 推定하는例도 있는 것으로 생각됩니다.

(4) 運動性

Corynebacterium屬이 創設되었을 때에는 이들은 運動性이 없다고 記錄되어있으나 後 土壤, 植物 등에서 snapping이나 .-字形을 나타내며 鞭毛를 가지고 運動하는 菌株가 分離되었습니다. 이들 菌株는 그 形態의性質에 따라 Corynebacterium屬에 包含되고 있습니다. 이런사실도 Corynebacterium屬의 概念이 擴大解釋되게된 理由의 하나입니다.

(5) 病原性

Corynebacterium diphtheriae가 디프테리아症의 病原微生物이라는 것은 말할것도 없으나, Lehmann과 Neumann은 Corynebacterium속을 創設한 當時에는 이 屬의 種으로서 人間과 動物의 寄生細菌을 생산하고 있었던 것입니다. 後는 鼻, 咽喉 其他 粘膜 등에서 分離되는 것을 포함시키고 있습니다. 後에 Jensen은 植物病原性에서 분리되는 것이나 腐生性的 菌들까지도 Corynebacterium屬에 포함시키게 되었습니다. 이것도 Corynebacterium의 同定을 困難케한 理由의 하나입니다.

(6) 生理的性質

Corynebacterium屬은 지. 까지 말씀드린 바와같이 그 細胞形態의 類似性에 따라 여러가지 擴大된 解釋을하여 왔습니다. 한편, 生理的性質에 관해서도 Coryneform bacteria의 範疇 (Category)에 포함되는 屬은 많아지고 있는 傾向이 보여집니다. 즉 1919년에 Orla-Jensen은 乳酸菌의 研究에서 糖에서 乳酸을 生成하며 陽性인 snapping分裂이 되는 細菌은 그 乳酸生成과 耐熱性を 근거로 microbacterium이라는 새屬으로 獨立시켰습니다. 그러나 最近의 研究에 따르면 이屬의 耐熱性是 疑心스럽다고 말하고들 있습니다.

1913年, Kellerman들은 土壤에서 多數의 Cellulose를 分解하는 細菌을 分離하였습니다. 그리하여 1923년에는 Bergey가 이들中 所屬이 명확치 않은 것을 Cellulose를 分解한다는 理由로 Cellulomonas라는 屬으로 정리하였습니다. 勿論 이屬도 Coryneform bacteria의 category에 해당하는 性質을 가지고 있습니다. 이와같이 特殊한 發酵生産이나 分解能에 重點을두어 屬을 獨立시킨것은 屬間의 相互關係를 複雜化하여 앞서 말한바와같은 性質을

가지는 細菌을 一括하여 coryneform bacteria라고 부르지 않으면 양되게 되었다고 생각됩니다. 말씀드린 바와같이 coryneform bacteria라고 불려지는 一群의 細菌分類의 混亂을 招來케된 한가지 理由는 corynebacterium屬의 擴大解釋인 것입니다. 다시 生物學的으로 類似한 細菌을 形態의 性質, 生物的性質과 生態的인 觀點에서 相互關係를 밝히지 않고 또한 類緣菌과의 境界를 밝히지도 않고 屬을 獨立시킨 결과이기도 합니다. 이러한 이유에서 自然界로부터 coryneform bacteria에 屬하는 細菌을 分離한 경우 그同定은 極히 困難하며 다시 新種 (new species)으로 할것인지는 研究者들이 가장 神經을 쓰는 問題입니다. 實際 우리들도 이 研究의 當初에는 腸內細菌이나 그밖의 細菌의 同定法을 시도해 보았으나 어느것도 성공하지 못하였습니다. 처음부터 말하여 온것과 같이 屬의 概念이나 屬相關係가 확실하지 않기 때문이라는것을 알았기 때문에 그 研究가 어려워도 時間이 걸려서도 이 問題를 根本的인곳부터 考察해서 이 問題를 解決하게 될것입니다. 그러므로 우리는 지금까지 보고되어 있는 coryneform bacteria의 實態는 어떻게 되있는가를 確認하고 그 相互關係를 먼저 細胞分裂의 樣式, DNA의 鹽基組成, 細胞壁成分부터 조사키로 하였던 것입니다. 後에 나아가 形態的 生理 生化學的性質을 詳細히 調査하기로 하였습니다. 使用한 菌株는 各國의 菌株保存機關(culture collection)으로부터 수집한 120菌株입니다.

Tested Bacteria	
Genus	No. of strain
Corynebacterium	37
Microbacterium	2
Cellulomonas	7
Arthrobacter	22
Brevibacterium	49
Total	117

Table 2. 供試菌株數

3. 著者들의 研究結果 紹介

다음에 우리의 研究結果에 대하여 말씀드릴것입니다.

(1) 細胞分裂의 樣式

Coryneform bacteria의 細胞分裂이 snapping이라는 特殊한 樣式을 나타낸다는 것은 앞서 말하였

입니다. 그러나 살아있는 細菌細胞를 高倍率 顯微鏡下에서 分裂되어가는 현상을 連續的으로 觀察한다는 것은 極 困難합니다. 또 生菌細胞는 光學的으로 콘트라스트가 약하다는 問題도 있습니다. 그래서 우리는 microculture technigue를 적용하여 顯微鏡映畫(microcinnematography)에 의하여 細胞分裂의 樣相을 觀하기로 하였습니다.

그결과 coryneform bacteria 및 比較에 사용한 eubacteria는 第 1圖에서 나타남과 같이 細胞分裂의 樣式에서 다음 3개의 型으로 나누어짐이 밝혀졌습니다.

(a) simple type

이 type는 細胞가 2배가량 伸長하면 가운데가 줄러지면서 細胞壁의 生成이 일어나며 細胞가 두

Mode of Cell Division

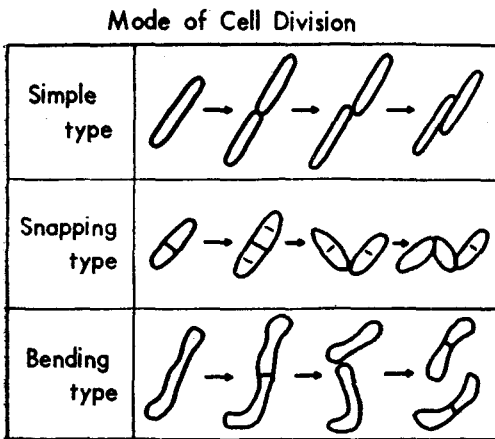


Fig. 1. Schematic mode of cell division of rod-shaped bacteria. Grouping of bacteria on the basis of the mode of cell division.

개로 분리합니다. 그리하여 계속 單純한 대별이 형상으로서 增殖합니다. 이것과 같은 type에 屬하는 것에는 Escherichia coli ATCC 9637, Alcaligenes faecalis ATCC 8750, Bacillus megaterium IAM 1030, Enterobacter aerogenes ATCC 7750, Pseudomonas fluorescens ATCC 13525, Serratia marcescens IAM 1105등이 있습니다. B. megaterium IAM 1010는 細胞隔壁은 잘 생기나 娘細胞는 이어진 狀態로 存在하므로 긴 連鎖狀을 나타냅니다.

(b) Snapping type

이 分裂은 먼저 細胞가 2배가량 伸長하여 그 사이에 細胞의 中央에 隔壁이 생기고 그후 急激히 한쪽 방향으로 꺾어지면서 分裂합니다. 소위 snapping division이란것입니다. snapping type의 分裂은 simple type의 그것과는 달리 細胞의 中央에 립(constriction)이 생기지 않는것이 特徵입니다. 또, snapping이 이러나는 時間은 瞬間的이라 할수 있을만큼 短時間으로 대략 數秒以內입니다. 그리고 두개의 娘細胞는 곧 분리되지 않고 이어진채로 V字型을 나타내는것이 普通입니다. 이두개와 娘細胞의 角度는 90°~120° 정도가되나 그 後生成長하면서 角度를 좁혀 다시 snapping에 의해서 分裂됩니다. 그結果 zigzag의 細胞配列 또는 不規則한 細胞配列이 생깁니다. 그리고 隔壁은 細胞의 中央 뿐만 아니라 말단쪽에도 생기기때문에 細胞의 形態는 점점 不規則하게 됩니다.

Corynebacterium diphtheriae ATCC 11913, Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869, Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872, Brevibacterium stationis ATCC 14403, Corynebacterium Xlrosis ATCC 7711, Microbacterium flavum ATCC 10340, Brevibacterium divaricatum URRL B-2311, Micrococcuo glutamicus ATCC 13032 등이 이 分裂樣式을 나타냅니다. Brevibacterium ammoniagenes의 分裂은 Corynebacterium diphtheriac와 같은 分裂을 합니다. snapping 分裂 결과 생긴 2개의 娘細胞는 떨어지지 않는 경우가 있으며 이경우에 V-字型의 細胞配列을 볼수있습니다.

Brevibacterium lactofermentum 글루타민酸生産菌이라고 알려져있으나 分裂의 樣式은 corynebacterium diphtheriae와 유사합니다. 큰細胞는 작은 細胞보다 頻繁하게 分裂하는 傾向이 있으므로, 細胞는 점점 작게 됩니다. 이 때문에 Corynebacterium의 細胞形態가 고르지못한 이유가 理解될 것 입니다. 글루타민酸生産菌으로서 잘 알려져 있는 Micrococcus glutamicus도 Corynebacterium과 같은 分裂을 나타냅니다.

이것을 우리들은 snapping type으로 부르기로 하였습니다.

(c) bending type

이 type의 分裂은 먼저 細胞가 약간 꺾어지면서 伸長하고 隔壁은 細胞의 中央 또는 끝쪽에 볼수있으나 snappig type와 같은 돌림현상은 볼수없습니다. 細胞는 隔壁이 있는 곳에서 서서히 꺾이며 때로는 V字型을 나타냅니다.

分裂後 두개의 細胞는 곧 분리합니다.

*Arthrobacter ureafaciens* ATCC 7562, *Brevibacterium linens* ATCC 8377, *Arthrobacter atrocyaneus* CCM 1645, *Arthrobacter Citreus* CCM 1647, *Arthrobacter globiformis* ATCC 8010, *Arthrobacter ramosus* ATCC 13727, *Arthrobacter simplex* ATCC 6946, *Arthrobacter tumescens* ATCC 6947, *Arthrobacter tumescens* IAM 1447, *Cellulomonas biogatea* ATCC 486, *Cellulomonas fimi* ATCC 8183, *Corynebacterium aquaticum* ATCC 14665

등이 이 Type의 分裂을 나타냅니다.

*Arthrobacter ureafaciens*의 分裂의 특징은 細胞는 약간 굽어지면서 生育합니다. 그리고 隔壁은 細胞의 中央이나 sub-terminal 에 생깁니다.

*Escherichia coli* 과 같이 줄림은 볼수 없습니다. 細胞와 隔壁이 있는 곳에서 천천히 굽어가므로 V 字型. 配列을 볼수있습니다.

이와같은 細胞分裂은 Bending type로 부릅니다.

石油資化性細菌으로서 알려져 있는 *corynebacterium hydrocarboclastus*도 bending type의 分裂에 의한 増殖을 합니다. 最近 이細菌은 여러가지 點에서 *Nocardia erythropolis*로 再同定 되었습니다.

방금 映畫에서 보신바와 같이 細菌의 分裂樣式은 3가지로 나눌수 있습니다.

그러나, 흥미있는 것은 simple type의 分裂에 의하여 増殖하는 것은 소위 eubacteria에 限하며 *Coryneform bacteria*는 포함되지 않습니다. 한편 *Coryneform bacteria*는 snapping type 또는 bending type의 分裂로서 増殖하며 simple type의 分裂을 나타내는 것은 없습니다.

그리고 지금까지 V字型의 細胞配列은 snapping 에 의하여 생긴다고 알고 있었으나만 bending으로로서도 생긴다는 것을 알수있습니다.

V-字型 細胞配列이 나타내는 것을 모두 *corynebacterium*에 포함시킨 과오가 理解되리라 생각합니다.

*Coryneform* 및 那類細菌이 여러가지 細胞形態를 나타낸다는것은 옛부터 알려져 왔으나 그 중 한가지는 分裂樣式에 있습니다. 그러나 *coryneform bacteroid*중에는 life cycle 에 따라 細胞形態가 變하는 것도 있으며 또 培養條件에 따라 變하는 것도 있습니다.

그러나 *corynebacterium diphtheriae*는 구연산酸鹽이 들어있는 培地에서는 대단히 規則한 形態를

나타내지만 구연산酸鹽이 없는 培地에 옮기면 snapping에 의하여 分裂합니다. 또 snapping은 固體培地뿐아니라, 液體培地에서도 볼수있으므로 細菌의 細胞分裂의 樣式은 각각의 細菌에 특유한 性質이라 생각할수 있습니다.

## (2) DNA의 GC-含量

다음에 DNA 鹽基組成(DNA base composition, 또는 DNA GC의 含量 GC-content in DNA)에 관하여 말씀드리겠습니다. 近年 微生物遺傳學研究는 遺傳을 지배하는 物質의基礎는 DNA에 있다는 것을 明白하게 있습니다.

그렇게되면 生物의 類緣을 알기 위하여 DNA의 構造를 調査하는것이 제일좋은 方法입니다만 이것은 現代의 科學에서도 극히 어려운 일입니다.

한편 DNA에 含有되는 鹽基(base)의 配列은 어느程度鹽基의 組成에도 反映되어 있다고 생각할수 있습니다.

여기서 DNA中の guanine과 cytosine를 加한 量이 全體의 鹽基中の 얼마만큼 찾아하는가를 DNA 鹽基組成 또는 DNA GC-含量이라해서 微生物의 類緣을 아는지표(index)로 삼고 있습니다.

DNA鹽基組成이 微生物의 類緣性을 나타내는 理由로서 다음과같은 實驗結果에서 알수 있습니다.

(1) DNA-DNA hybrid와 GC-含量이 가까운 것이어야 합니다.

(2) 닮아있는 微生物끼리의 GC-含量을 比較하면 서로 含量이 유사하다. 닮지않은 微生物끼리의 GC-含量이 닮지않았음니다.

다음 以上과 같은 理由에서 細菌의 DNA의 GC-含量은 細菌을 알기위한 좋은 方法입니다. *Coryneform bacteria*에 관해서는 지금까지 그다지 알려져 있지 않았음니다.

그래서 우리가 *coryneform bacteria*의 DNA의 GC-含量을 測定하였다. 그러나 實際實驗하여본 즉 文獻대로 되지않아 苦生하였음니다. 結果적으로 는 lysozyme에 非感受性인(Insensitive) 菌株는 glycine를 加하여 배양하면 lysozyme sensitive으로 되어 細菌壁을 lysozyme로서 녹여서 DNA를 採取할수있게 되었습니다.

이때문에 約3년에 걸렸음니다만, *Coryneform bacteria*의 GC-含量을 廣範圍하게 測定한 研究는 現在까지 우리의 研究뿐이라고 생각됩니다.

그 結果는 그림 2에 나타내었습니다.

그림 2.에서 알수있듯이 *coryneform bacteria*에

Distribution of GC content of Coryneform bacteria  
GC content (%)

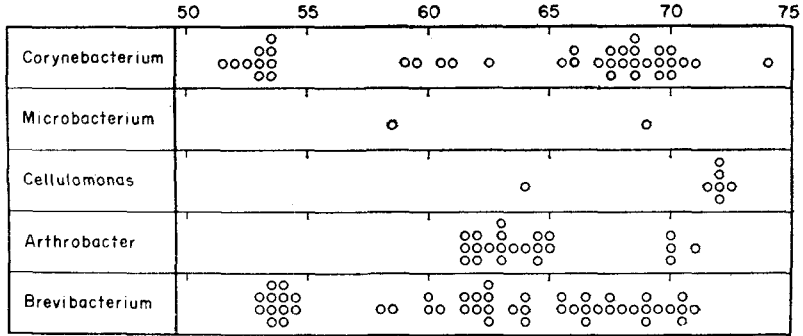


Fig. 2. Coryneform bacteria의 DNA의 GC-함량의 분포

屬하는屬(genus)中에서 比較的 일정한 GC-함량을 나타내는것은 cellulomonas뿐이었습니다.

즉, Corynebacterium라고 이름부친 菌株의 GC-함량은 52%에서 74%사이에 있고 Brevibacterium라고하는 菌株의 GC-함량은 53%에서 71%사이에 分布되어 있습니다. 또, GC-함량이 거의같은 菌株를 모아서 그集團에 포함되는 菌株는 역시 heterogeneous이며 coryneform bacteria를 GC-함량의 點만으로 屬을 獨立시킬수는 없었습니다.

이것은 corneform bacteria가 어떻게 heterogenous의 細菌인가를 말하여주고 있는 것입니다.

### (3) 細胞壁成分

다음에 細胞壁(cell wall)의 成分으로 본 corneform bacteria에 관해서 말씀드리겠습니다. 영국의 Cummins라는 사람이 gram positive bacteria나 放線菌(actinomycetes)의 細胞壁를 構成하는 아미노酸이나 糖의 種類는 細菌의 類縁을 알리기위한 좋은 근거로 될수있다는 보고를 하였으므로 우리도 coryneform bacteria에 관해서 이것을 調查하기로 하였습니다.

Cummins와 大體로 同一한 方法으로 細胞壁를 調製하고 아미노酸이나 糖의 種類에 관해서 調査한 결과 L-lysine, meso-diaminopimelic acid, meso-DAP, LL-diaminopimelic acid, LL-DAP L-ornithine과  $\gamma$ -diaminobutyric acid, DAB의 二鹽基性 아미노산(dibasic amino acid)의 存在는 屬(genus)의 레벨로서 意味가 있는 것으로 생각됩니다.

그러나 糖의 種類는 屬의 ty-e에서는 그다지 意味가 없는것으로 생각됩니다. 細胞壁의 組成도 이것만으로는 명확한 結論을 낼수가 없었습니다.

다행히도 앞서말씀드린 細菌分裂의 type와 함께 생각하여 본즉, 興味있는 事實을 알수 있었습니다. 즉, 細胞壁에 meso-diaminoimelic acid를 含有하는 菌株는 一般的으로 snapping에 의하여 分裂 增殖하여 그밖의 lysine, ornithine, LL-DAP, DAB를 含有하는 菌株는 bending type의 細胞分裂로서 增殖하는것을 알았습니다. 또 後에 말하지만 細胞壁의 murein의 構造가 이들 아미노酸과도 關係가 있는것을 알았습니다.

### 4. Coryneform bacteria의 grouping

지금까지 coryneform bacteria의 細胞分裂樣式이나 DNA의 GC-함량을 調查하여 보았으나 . . . coryneform bacteria의 全體를 理解하기가 어려웠습니다. 그리고 이研究를 시작하여 6~7년이 지났으므로 今後 이 研究를 어떻게 하면 좋을까하고 머리를 짜고 있습니다. 따라서 細胞壁組成의 data를 얻었을때도 무엇인가 進步시킬 근거가 없나 하고 여러가지 角度에서 檢討하였습니다. 그리하여 細胞分裂과의 關係를 찾아냈을 때 비로소 이 問題 解決의 한단계 나아간듯한 생각이 들었습니다.

그리하여 우리는 지금까지의 data를 재검토하게 되었습니다. 즉, 그림 3에 나타낸바와 같이 縱에 細胞壁의 主要아미노산(principal amino acid in the cell wall)과 細胞分裂의 樣式을 X축에 DNA

Mode of Cell Wall Type

	Snapping		Bending	
meso-DAP	Cory. callunae	AJ 1518	Cory. hydrccarboelastus	AJ 1379
	Cory. diphtheriae	AJ 1414	Brev. linens	AJ 1520
	Cory. herculis	AJ 1543		
	Cory. xerosis	AJ 1375		
	Brev. ammoniogene.	AJ 1443		
	Brev. divaricatus	AJ 1498		
	Brev. flavum	AJ 1485		
	Microbact. flavum	AJ 1415		
	Micrococcus glutamicus	AJ 1502		
L-Lysine			Arth. aurescens	AJ 1530
			Arthg citreus	AJ 1423
			Arth. globiformis	AJ 1422
			Arth. oxydans	AJ 1425
			Brev. sulfureus	AJ 1478
L-Ornithine			Cell. biazotea	AJ 1569
			Cell. gelida	AJ 1567
			Cell. uda	AJ 1568
			Cory. flaccumfaciens	AJ 1400
			Brev. albidum	AJ 1472
			Brev. citreum	AJ 1469
			Brev. testaceum	AJ 1464
LL-DAP			Brev. lipolyticum	AJ 1450
			Arth. simplex	AJ 1420
DAB			Cory. aquaticum	AJ 1413
			Cory. michiganense	AJ 1390

Table 3. 細胞壁의 Type와 細胞分裂의 樣式

의 GC-含量을 取하여 여기에다 供試菌의 구르타민산을 넣어 보았습니다. 그러니까 각 菌株가 屬하는 屬名(generic name)과는 無關하게 coryneform bacteria는 몇가지 group으로 나눌수 있었습니다.

그리하여 meso-DAP를 細胞壁에 含有하는 것은 動物起因(animal origin)의 것이 많거든가 L-lysine을 含有하는 土壤이나 植物에서 유래되는 것을 알게되었습니다. 다시 최근에 試驗한 糖에서 酸의 生成이라든가 세라친의 液化등의 結果를 생각하여 보던 각 group에 共通 性質이 있는것같이 생각되었습니다.

여기서 다시 供試菌의 形態의, 生理, 生化學的 性質을 될수있는데로 詳細히 試驗하기로 하였습니다. 예를들면 糖에서 酸의 生成에 關하여서는 28種의 糖에 對하여 調査하고 有機酸의 資化性에 對하여는 22種類의 有機酸에 對하여 調査하였습니다.

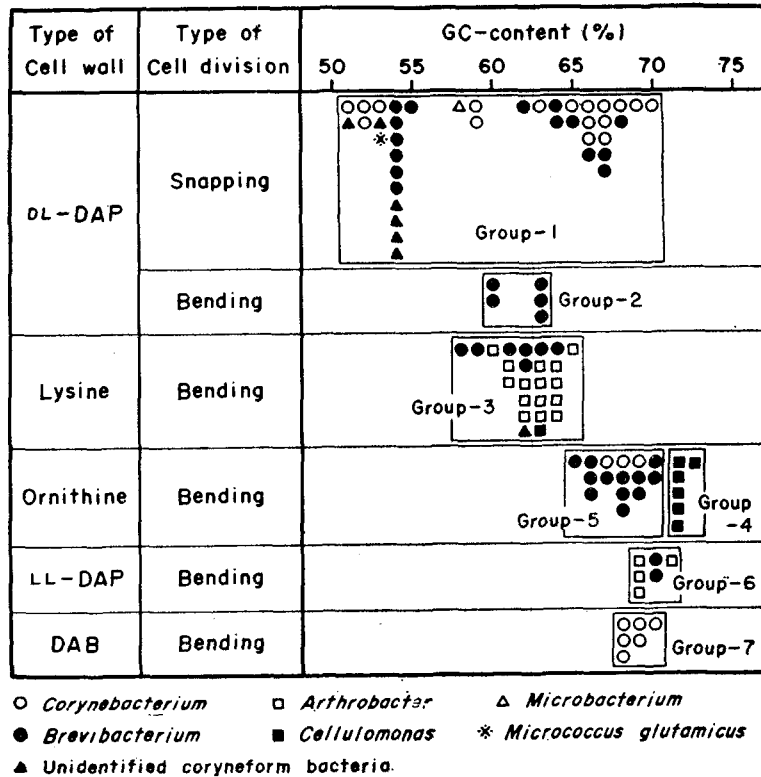
각각의 group에 共通의인 主要性質을 슬라이드에 나타내었습니다. 예를들면 細胞壁에 meso-DAP를 含有하는것은 strongly gram이며 DNase는 없으나 細胞벽에 L-lysine을 含有하는것은 弱陽性(weakly gram positive)이며 DNase를 가지고 있었습니다.

group 4와 5는 어느것이나 細胞壁에 ornithine를 含有하고 있으나 生化學的으로 아주 다르므로 2종으로 나누었습니다. 이와같이하여 coryneform bacteria의 일곱개의 group는 각각 獨立된 性質을 가지는 것을 알았습니다.

우리가 試驗한 구르타민酸 生産菌은 모두 group 1에 속하고 게다가 DNA의 GC-含量은 54% 前後였습니다.

最近 우리는 細菌의 磷脂質(phospholipid)와 分類와의 關係에 興味를 가지고 있습니다. 細菌의 磷脂質은 膜組織(membrane system)에 存在하므로

Fig 3. Grouping of Coryneform Bacteria



3Table 4. Characteristics to differentiate seven groups of coryneform bacteria.

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7
Type of cell wall	DL-DAP	DL-DAP	Lysine	Ornithine		LL-DAP	DAB
Type of cell division	Snapping	Bending	Bending	Bending	Bending	Bending	Bending
GC content (%)	51-70	60-63	58-65	72-73	66-71	70-72	69-71
Gram-stain	Strongly positive	Strongly positive	Weakly positive Cystite: Strongly positive	Weakly positive	Weakly positive	Weakly positive Cystite: Strongly positive	Weakly positive
Motility	Non-motile	Non-motile	Non-motile or motile	Motile or non-motile	Motile or non-motile	Motile or non-motile	Non-motile or motile
Metachromatic granule	+	-	-	-	-	-	-
Pleomorphism	Not distinctive	Not distinctive	Remarkable Cystite	Fairly distinctive	Weakly	Distinctive Cystite elongation branching	Slightly
Citrate effece	+	±	±	Inhibit	-	-	-
Acid production fromsugars	+ or -	-	-	+(strongly) rapidly	+ weakly (slowly)	-	-
Utilizatoin of organic acids	+	+	+(widely)	+(restricted)	+	+	+
Hydrolysis of gelatin	-	+	+	+(slowly)	+(slowly)	+	+ or -
DNase activity	-	+	+	-	+	+	+
Urease activity	+ or -	-	- or +	-	-	-	-



細菌의 類緣을 알수있는 한가지 方法이라고 생각하기 때문입니다.

磷脂質의 分析은 어려우나 우리는放射性磷 (32p)를 培地에 加하여 生育된 細菌細胞에서 磷脂質을 抽出하고 이것을 chromatography와 放射能의 分布에서 燻脂質의 組成을 아는 方法을 開發하였읍니다. 그 結果, coryneform bacteria의 일급 group는 각각 特徵있는 phospholipid patlern을 나타내었읍니다.

### 5. Mureim構造와의 關係

우리는 coryneform bacteria를 지금까지 말씀드린 바와같은 생각으로 연구하고 있는데 독일의 Kandler 일파는 細胞壁의 peptidoglycan의 構造에서 coryneform bacteria의 研究을 하고 있었읍니다. 多幸히도 그들의 菌株과 우리가 研究하고있는 菌株가 거의 同一하였으므로 兩者의 研究를 比較對照해 볼수있었읍니다.

細菌의 細胞壁은 N-acetylglucosamin과 N-acetylmuramic acid가 서로 結合하여 그 사이가 peptide로서 結合되어 있는것으로 생각합니다. 슬라이드에 그 模式圖을 나타냅니다.

그리고 그 peptide bride는 슬라이드에 나타낸 바와같이 2個의 subunit와 그것을 연결하는 interpeptide linkage로 나누어집니다. 이部分의 構造와 coryneform bacteria의 分類와의 關係에 對하여 생각하여 보았읍니다.

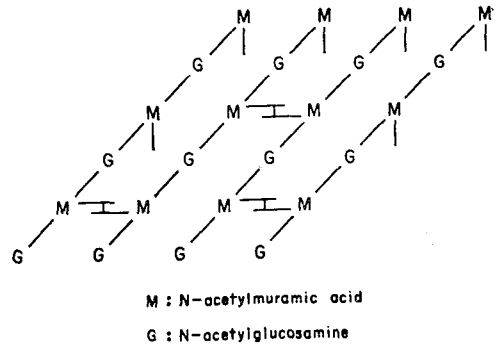
우리가 grouping한 2번째와 3번째의 아미노산이 m-DAP이며 他 subunit와는 直接結合되어있는 direct type였읍니다. group는 構造的으는 group 1과 동일하나 糖의 組成에는 차이가 있었읍니다.

그리고 group 1에는 Corynebacterium diphtheriae 나 소위 글루타민酸菌이 포함되었읍니다. group 3은 3번째의 아미노산이 L-lysine이며 A. globiformis의 interpeptide는 3개의 아라닌으로 되어있읍니다. 이 interpeptide는 菌種(species)에 따라 다르지만 基本的인 構造는 同一합니다.

group 4는 3番째, 아미노산이 L-ornithine이며 sub-unit의, 사이에는 glutamic acid 또는 aspartic acid가 1個들어 . 읍니다. 그리고 Cellulomonas가 이構造를 나타내었읍니다. group 5는 좀 달랐읍니다.

2번째의 아미노산이 다른 4번째의 아미노산과 結合하여 있는 type입니다. 이것은 interpeptide에 D-ornithine를 含有하며 이 group에도 우리가 말하는 motile brevibacteria가 들어갑니다.

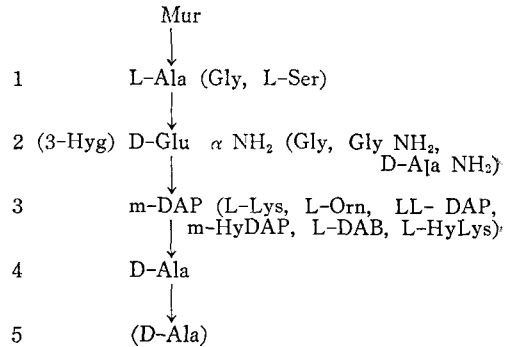
### A Schematic Representation of the Organization of the Infact Murein Sac



[After J. M. Ghuyssen]

Fig. 4. Murein 構造의 模式圖

### Variations of Peptide Subunit Found in Bacterial Cell Wall



[After K. H. Schleifer and O. Kandler]

Fig. 5. 細菌의 細胞壁의 Peptide Unit

우리는 group 4와 group 5는 양쪽다 ornithine을 含有하나 生理的 生化學的으로 다르므로 각각 별개의 group로 하였다. 말하였읍니다. 實際로 murein의 構造가 基本的으로 달랐읍니다.

group 6은 3번째의 아미노산이 LL-DAP이며 interpeptide는 glycine을 含有하는 것입니다. 7은 2번째의 아미노산이 다른 sub-unit와 結合하여 이것은 subunit에 L-DAB를 interpeptide에는 D-DAB를 含有하는 것입니다.

이와같이 우리가 여러가지 觀點에서 grouping한 coryneform bacteria는 murein의 一次構造(primary structure)에서 보아도 모순이 되는 것이 아니었읍니다.

Primary Structures of Peptidoglycans Found in Coryneform Bacteria

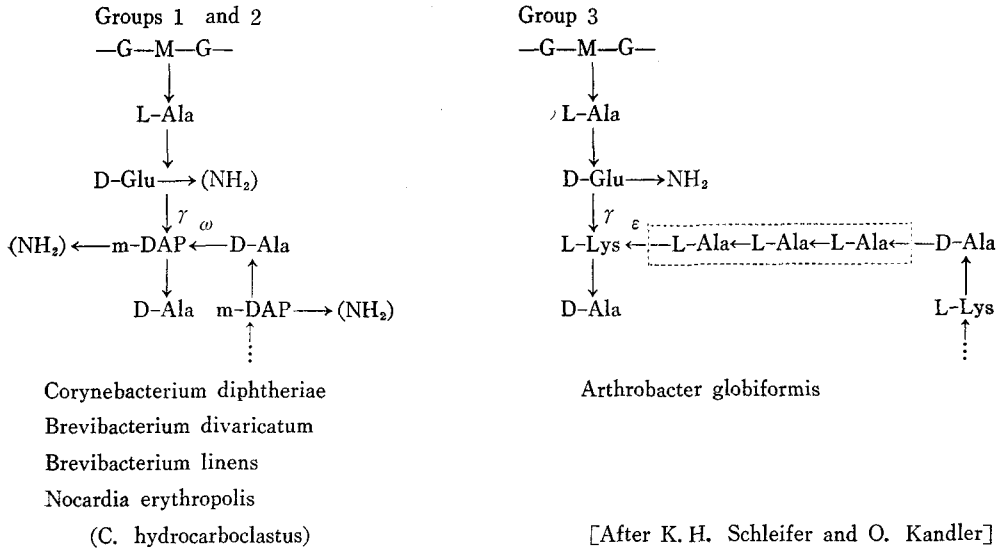


Fig. 6. Group 1, 2, 및 2의 peptidoglycans, 構造

Primary Structures of Peptidoglycans Found in Coryne Coryneform Bacteria

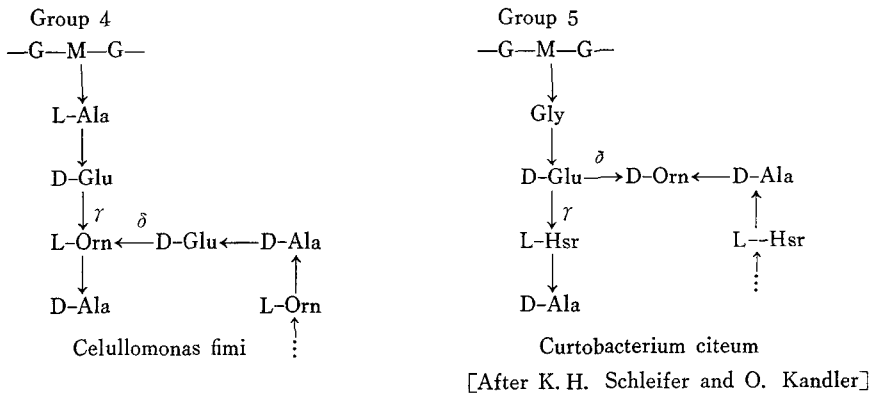


Fig. 7. Group 3 및 4의 peptidoglycans의 構造

Primary Structures of Peptidoglycans Found in Coryneform Bacteria

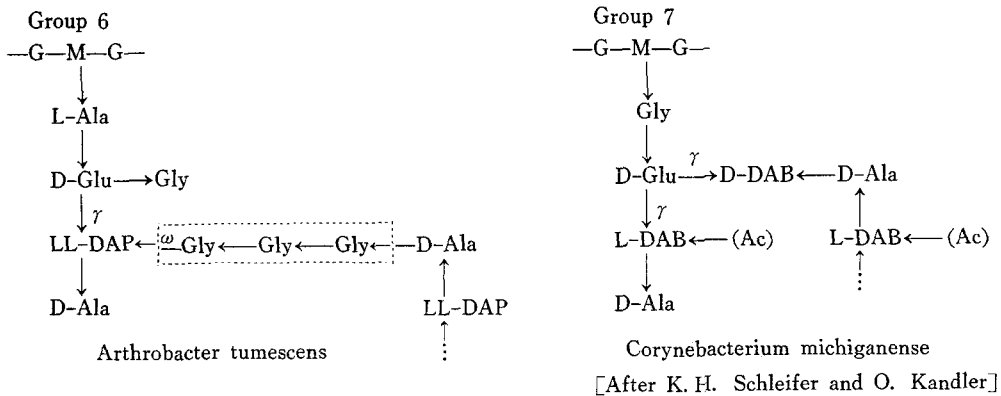


Fig. 8. Group 6 및 7의 peptidoglycans의 構造

## 6. Coryneform bacteria의 分類

지금까지 나는 Coryneform bacteria에 포함되는 細菌은 從來細菌의 分類나 同定에 適用되어온 性質단으로는 屬의 概念을 明白하게 할수없으므로 또 最近의 分類學的發想에 근거를두고 DNA의 GC—含量이나 細胞壁成分만으로도 屬의 概念을 明白히 알수없다고 말씀드려왔습니다. 그러나 우리는 各 菌株保存機關에서 수집하였을때의 學名에 구애되지 않고 GC—含量이나 細菌壁成分과 같은 化學的인 成分을 組合하여 供試菌株를 grouping을 試圖하여 成功하였읍니다.

細胞를 構成하는 化學成分을 기초로하여 生物分類하는 것을 chemotaxonomy라고합니다. 또, 여러가지 角度에서 實驗結果를 組合하여 分類하는 것을 polyphasic taxonomy라고 합니다.

우리는 以上の 結果에서 coryneform bacteria를 슬라이드에 나타낸바와같이 分類하는 것이 가장 適當하다고 합니다. 細胞壁의 아미노산 組成을 첫째로 한것은 이性質이 가장 다른 性質과 關連이 깊기 때문입니다.

### *Coryneform bacteria*

Aerobic, strongly gram-positive or weakly gram-positive, non-spore forming, not acid-fast, rod-shaped bacteria.

#### Key to the genera of coryneform bacteria

I. DL-Diaminopimelic acid is found in the cell wall.

Strongly gram-positive. Non pleomorphic.

A. Snapping cell division is recognized.

Metachromatic granules are found in the cells.

Gelatin is not hydrolyzed.

GC content ranges from 51 to 70%.

Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann, 1896.

Type species: *Corynebacterium diphtheria* (Flügge) Lehmann and Neumann.

B. Bending type of cell division is recognized.

Metachromatic granules are not found in the cells.

Gelatin is hydrolyzed.

GC content ranges from 60 to 63%.

Genus *Brevibacterium* Breed, 1953.

Type species: *Brevibacterium linens* (Weißmann) Breed.

II. Lysine is found in the cell wall.

Pleomorphic, weakly gram-positive or gram-negative cells and strongly gram-positive large spherical bodies, cystites, are frequently found in older cultures.

No acid is produced from any sugars.

Gelatin is hydrolyzed.

GC content ranges from 58 to 65%.

Genus *Arthrobacter* Conn and Dimmick, 1947.

Type species: *Arthrobacter globiformis* (Conn) Conn and Dimmick.

III. Ornithine is found in the cell wall.

A. Acids are produced strongly and rapidly from many kinds of sugars.

Organic acids are not assimilated except acetate, pyruvate, and lactate.

GC content ranges from 72 to 73%.

Genus *Cellulomonas* Bergey et al. 1923, emend. Clark 1952.

Type species: *Cellulomonas biazotea* (Kellerman et al.) Bergey et al.

B. Acids are produced weakly and slowly from some sugars.

Acetate, pyruvate, lactate, and other organic acids are assimilated.

GC content ranges from 66 to 71%.

Genus *Curtobacterium* nov. gen.

Type species: *Curtobacterium citreum* (Komagata and Iizuka) comb. nov.

IV. LL-Diaminopimelic acid glycine are found in the cell wall.

Elongated or branched cells are frequently found in ordinary media.

GC content ranges from 70 to 72%.

*Bacteria belonging to Group 6.* (LL-DAP type coryneform bacteria)

V.  $\alpha$ ,  $\gamma$ -Diaminobutyric acid is found in the cell wall.

GC content ranges from 69 to 71%.

*Bacteria belonging to Group 7.* (DAB type coryneform bacteria)

### Table 5. Coryneform bacteria의 分類

제 1 group는 meso—DAP를 細胞壁에 含有하고 snapping에 의하여 分裂하는 細菌입니다만 GC—

含量이 52~56% 사이에 있으면서 典型的으로 *Corynebacterium*의 性質을 나타내는것이 포함됩니다. *Corynebacterium*는 먼저말한바와같이 1896년에 Lehmann에 의하여 創設된 屬입니다. 1960년 이후 여러가지로 擴大解釋되어 왔습니다.

그러나 우리는 本來의 *corynebacterium*는 지금 말씀드린 性質을 가지는 菌株에 한한것이라고 생각합니다.

한屬의 가운데서 GC-含量的의 差가 20% 이상 있는 것은 DNA의 構造에서 이屬이 heterogenous 라는것을 뜻하고 있습니다. 그러나 現在 우리의 實驗結果에서는 GC-含量이 높은 group와 낮은 group를 別個로 할 根據가 없으므로 한屬으로 정리 하였습니다. 最近 우리는 磷脂質(phospho lipid)의 組成에서 GC-含量이 높은것은 *Nocardia*에 닮은것이 아닌가고 생각합니다.

group 2는 group 1과 分裂樣式과 細胞壁中の 糖의 種類에 差가 있습니다. 그리고 이 group에는 *Brevibacterium linens*가 포함됩니다. *Brevibacterium*도 屬의 概念이 明白하지 않으므로 아주 heterogenous인 屬입니다. 故에 waste basket genus라고 까지 불리어지고 있습니다. 그러나 우리는 1953년에 Breed가 이屬을 창립하였을때의 속의 概念을 忠實히 지키던 *Brevibacterium*는 이와 같은 性質을 가진 菌株에 限定된다고 생각합니다.

group 3은 細胞壁에 lysine을 含有하는 菌株이며 그들은 特徵있는 形態變化和 生理的性質을 나타냅니다. 이것은 1947년에 創立된 *Arthrobacter*屬의 概念에 一致됩니다. 이屬도 아주 擴大解釋되어 왔으나 우리의 chemotaxonomical 한 研究에서 確實한 屬의 概念을 確立할 수 있다고 생각합니다.

group 4는 細胞壁에 ornithine을 含有하는 것인데 앞서 말한바와 같이 다음, group 5와는 細胞壁에 含有되는 ornithine이 構造上의 結合樣式이 다르며 또 生理的性質도 다릅니다. 그리고, 이 group에는 *Cellulomonas*라고 固定된 菌株가 포함됩니다. 그러나 이들 菌株에 Cellulose의 分解能은 認定할 수가 없었습니다. 이것은 供試한 菌株가 오랫동안 菌株保存業關에서 保存되고 있는동안에 分解能을 상실한 것으로 생각합니다.

group 5에는 우리가 실험실에서 分離하여 motile *brevibacteria*로서 報告한 菌株가 포함됩니다. 나는 1956년頃, 運動性있는 無孢子 gram陽性의 小桿菌을 分離하고 그性質을 研究하였는데 分類學上의 位置를 決定할 수가 있습니다. 分離後 8년이 지나

서 일단 *Brevibacterium*에 所屬시켰으나 이번 研究에서 이들 細菌은 *coryneform bacteria*의 어느 group에도 屬하지 않는다는것을 알았으므로 새로운 屬 *Curtobacterium*로 하여 獨立시켰것입니다.

또한 *Curto*는 말은 짧다는 의미입니다.

group 6은 細胞壁에 LL-DAP를 含有하며 많은 量的 glycine을 含有하므로 放線菌中の *streptomyces*에 類緣한 細菌이라고 생각된다.

group 7은 細胞壁에  $\gamma$ -diaminobutyric acid를 含有하는것이나 菌株數가 적으므로 詳細한것은 後研究과제로 생각하고 있습니다.

## 7. 글루타민산菌에 관하여

이강연의 最初에 구르타민酸菌의 同定이 研究者에 따라 다룬데 그것은 *coryneform bacteria*에 관한 지식이 모자라고 그分類가 不完全하기 때문이라고 말씀드렸습니다. 그럼 여기서 우리가 polyp-hasic taxonomy의 立場에서 整理한 *Coryneform bacteria*의 分類에서 볼것같으면 소위 구르타민酸菌은 어떻게 되든지 살펴봅시다. 우리가 試驗한 범위內에서는 글루타민酸菌은 細胞壁에 meso-DAP를 含有하며 snapping type에 의한 細胞分裂을 하며 DNA의 GC는 54% 前後입니다. 또 生理的 生化學的으로도 아주 類似합니다. 이런사실로서 소위 구르타민酸菌은 *Corynebacterium*에 포함되는 것으로 생각합니다. 그러나 2種(species)의 問題에 있어서는 他種과의 關係를 새로운 分類學의 手法를 適用하여 검토치않고는 輕率하게 結論내릴 수가 없다고 생각합니다.

또 石油資化性菌으로 알려져 있는 *Corynebacterium hydrocarboclastus*菌도 우리의 研究에 따라 *Nocardia erythropolis*라고 再同定되었읍니다.

## 8. 結 論

應用微生物學의 分野에서는 소위 雜菌이라고 말하고있던 微生物이 갑자기 참피온으로 등장하는 예도 적지않습니다. *coryneform bacteria*도 그러합니다. 지금까지 아무도 주목하지 않았던 細菌이 生化學的 研究의 分野에서 産業의 分野에서 놀랄만 한 공헌을 하고 있습니다. 여기에 비하면 微生物分類學의 進歩는 극히 완만한 것으로 보입니다.

進歩의 tempo가 느린것으로 생각됩니다.

그러나, 微生物分類學은 微生物學의 가장 基礎가 되는것입니다. 그리고 그研究方法는 從來의 表現型(phenotype)만에 따를것이 아니라 遺傳學的

背景, 代謝生理, Ultrastructure 등의 近代生物學의 지식을 充分히 理解하고 그것을 微生物分類學獨自의 것으로하여 發展시키지 않으면 안되겠습니다. 그러기 위해서는 微生物分類 研究에 종사하는 사람들은 表면에 나타나지 않으면서 扎实的 研究를 長年間 계속할 覺悟가 必要하며 同時에 他分野의 研究者와 서로 協調가 必要하다고 생각합니다.

또, 微生物分類學을 다른말로 표현하면 「微生物은 어떠한 生物인가?」라는 것을 생각하는 學問分野라고 할수있습니다. 이런것은 微生物을 다만 酵素의 주머니가 아니고 아주 多樣性있는 生物이라고 理解할수 있을 것입니다.

나아가서 自然界에 있어서 微生物의 모습을 알기위하여서는 그生態(ecology)를 研究하지 않으면 不됩니다.

그自의때문에 微生物分類學이 크게 公認하고 있다는 사실은 말할必要가 없다는 것입니다.

즉 近代微生物學으로서의 微生物分類學으로서의 미생물분류학의 연구는 단순히 응용미생물학에 공헌하고 있을뿐만아니라, 우리들 人類를 에워싼 自然環境을 얼마나 풍요하게 보존하고 地球上的의 生物들이 다같이 生存하기 위하여서는 크게 공헌 한다고 믿고 있습니다. 장시간 淸강 감사합니다.

## 9. 參 考 文 獻

1. K. Komagata, K. Yamada and H. Ogawa Taxonomic studies on coryneform bacteria I. Division of bacterial cells J. Gen. Appl. Microbiol., **15**, 243 (1969)
2. K. Yamada and K. Komagata Taxonomic studies on coryneform bacteria II. Principal amino acid in the cell wall and their taxonomic significance J. Gen. Appl. Microbiol., **16**, 103 (1970)
3. K. Yamada and K. Komagata Taxonomic studies on coryneform bacteria III. DNA base composition of coryneform bacteria J. Gen. Appl. Microbiol., **16**, 215 (1970)
4. K. Yamada and K. Komagata Taxonomic studies on coryneform bacteria IV. Morphological, cultural, biochemical and physiological characteristics J. Gen. Appl. Microbiol., **18**, 399 (1972)
5. K. Yamada and K. Komagata Taxonomic studies on coryneform bacteria V. Classification of coryneform bacteria J. Gen. Appl. Microbiol., **18**, 417 (1972)
6. I. Komura, K. Komagata and K. Mitsugi A comparison of *Corynebacterium hydrocarboclastut* Iizuka and Komaga 1964 and *Nocardia erythropolis* (Gray and Thornton) Waksman and Henrici 1948 J. Gen. Appl. Microbiol., **19**, 161 (1973)